



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**VALIDAÇÃO DOS PROCESSOS ENVOLVIDOS NO CULTIVO
DA BACTÉRIA *Haemophilus influenzae* tipo b PARA
PRODUÇÃO DE VACINA**

Fabio Henrique F. S. Gonzalez

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito final para a obtenção do Diploma de Mestre em Ciências em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Rio de Janeiro
Março 2007

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**VALIDAÇÃO DOS PROCESSOS ENVOLVIDOS NO CULTIVO
DA BACTÉRIA *Haemophilus influenzae* tipo b PARA
PRODUÇÃO DE VACINA**

Fabio Henrique F. S. Gonzalez

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro como requisito final para a obtenção do Diploma de Mestre em Ciências em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA (com as respectivas assinaturas)

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa, IQ/UERJ - Orientador

Prof^a. Dr^a. Joana Mara Teixeira Santos, IQ/UERJ

Prof. Dr. Manoel Antonio da Fonseca Costa Filho, FEN/UERJ

Prof. Dr. Mauro Velho de Castro Faria, IBRAG/UERJ

**Rio de Janeiro
Março 2007**

*A Deus, a minha família e a minha noiva por estarem presentes
na minha vida e por nunca permitirem que eu desista.*

AGRADECIMENTOS

➤ Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa, pelo apoio, críticas, dedicação, ajuda, sugestões e estímulo que foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

➤ Ao Laboratório de Metrologia e Validação de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, e aos seus profissionais, pela troca de experiências que foram de fundamental importância para a minha formação na área de validação.

➤ Ao meu chefe e amigo Luiz Alberto Lima por me convencer a cursar o mestrado junto com as minhas atividades profissionais e por sempre me lembrar da importância das “acabativas”.

➤ Aos membros da equipe de Validação de processos de Bio-Manguinhos que sempre se mostraram altamente competentes e compreensivos nas minhas ausências durante todo o andamento deste trabalho.

➤ A equipe de Validação de equipamentos térmicos por executarem os ensaios de mapeamento térmico durante a validação do processo de esterilização e dos processos de cultivo e inativação.

➤ A equipe de fermentação do DEBAC por fornecerem os dados de controle de processo usados neste trabalho.

➤ Aos meus amigos especiais “Babi”, “Mamão”, Renata e Márcia Denegri pelo total apoio no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

➤ Aos membros da banca por aceitarem o convite.

➤ A minha noiva Gil, a quem amo de paixão, por ficar ao meu lado, mesmo quando não podia ter minha atenção, me incentivando nos momentos difíceis, e me lembrando que os momentos bons e felizes estão sempre presentes. Sem ela não teria conseguido chegar até aqui.

➤ Agradeço, finalmente, à minha família pela compreensão com os momentos subtraídos de nosso convívio que precisei dedicar ao Mestrado.

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalez, F. H. F. S

Validação dos processos envolvidos no cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b para produção de vacina / Fabio Henrique F. S. Gonçalez. Rio de Janeiro: UERJ/IQ, 2007.

xv, 94 p.; Il.

(Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, 2007. Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa.

1. Validação. 2. Processos. 3. Fermentação. 4. Lavagem
5. Esterilização. 6. Inativação. 7. *Haemophilus*. 8. Tese.
(Mestrado – UERJ/IQ).

9. Orientador: Antonio Carlos Augusto da Costa.

I – Título

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo analisar os principais aspectos da validação dos processos de apoio e finalísticos envolvidos na fermentação do microrganismo *Haemophilus influenzae* tipo b para a produção de vacina em Bio-Manguinhos, buscando demonstrar que os resultados das análises dos controles de processo executados permitem uma avaliação de parâmetros específicos, assegurando tanto a robustez do processo como a qualidade do produto.

Foram realizadas as validações dos processos de esterilização e de limpeza do fermentador BIOSTAT D200, e as validações dos processos de cultivo do microrganismo em questão e de sua inativação térmica.

Na validação do processo de esterilização todos os pontos monitorados em relação à temperatura atingiram o valor mínimo de 121,10 °C necessários a esterilização, gerando um valor de F0 acumulado mínimo de 23 minutos, acima dos 16 requeridos pelo lote de bioindicador utilizado.

Na validação da limpeza os parâmetros analisados apresentaram os seguintes valores: pH variou de 5,58 a 6,58, a condutividade de 0,67 a 0,92 µS/cm, o TOC entre 130 e 165 ppb, e a concentração de endotoxina foi menor que 0,25EU/mL demonstrando uma redução sempre igual ou superior a 3 log (1000X) em relação a sua concentração inicial.

Os lotes se mostraram homogêneos sem apresentação de tendência ou desvios de qualidade. Além disso, todos os cultivos analisados se mostraram livre de contaminação por outro microrganismo ao final do processo, sendo que a sua inativação também se mostrou eficiente.

ABSTRACT

The purposes of this work were to evaluate the main aspects of the validation of the main and support processes involved in the fermentation of a culture medium by the microorganism *Haemophilus influenzae* type b for the production of vaccines at Bio-Manguinhos and to demonstrate that the obtained results of the "in process controls" conducted during the time-course of the process for specific parameters, would ensure the robustness of the process and the quality of the product.

The BIOSTAT D200 fermentor sterilization and cleaning processes validation as well as the culture process and the thermal inactivation validation have been carried through.

In the sterilization process validation all the points monitored for temperature reached the minimum value of 121. °C, generating a minimum value of accumulated F0 equal to 23 minutes, higher than 16, required by the lot of bioindicator used.

During the validation of cleaning, the evaluated parameters presented the following values: pH ranged from 5.58 and 6.58, conductivity between 0.67 and 0.92 mS/cm, TOC between 130 and 165 ppb and endotoxin concentration was kept below 0.25 EU/mL, demonstrating a 3 log reduction (1000X) in relation to its initial concentration.

All the lots were homogeneous without presenting trends or quality deviations. Moreover, all the inocula tested were free of contamination by other groups of microorganisms during the whole process until process finalization, indicating an efficient inactivation.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPC – Boas Práticas Clínicas
BPE – Boas Práticas de Engenharia
BPL – Boas Práticas de Laboratório
CEP – Controle estatístico de processo
CFR – “Code of Federal Regulation”
CIP – “Clean in Place”
CQT – Controle de Qualidade Total
DI – Documento Interno
D.O. – Densidade Ótica (Absorbância)
DP – Desvio Padrão
EU – “Endotoxin units”
EUA – Estados Unidos da América
F0 – Letalidade em minutos
FDA – “Food and Drug Administration”
GAMP – “Good Automated Manufacturing Practice”
GMP – “Good Manufacturing Practices”
Hib – *Haemophilus influenzae* tipo b
ISO – “International Standardization Organization”
ISPE – “International Society for Pharmaceutical Engineering”
LAL – Lisado de Amebócitos do *Limulus polyphemus*
LI – Limite Inferior
Log – Logarítmico
LS – Limite Superior
NAD – Adenosina Dinucleotídeo Nicotinamida
NBR – Norma Brasileira
OMS – Organização Mundial de Saúde
ppb – Parte por Bilhão
PS – Polissacarídeo
QI – Qualificação de Instalação

QO – Qualificação de Operação
QP – Qualificação de Performance
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
rpm – Rotações por Minuto
SIP – “Steam in Place”
TOC – “Total organic carbon”
TxCr – Taxa de Crescimento
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
USP – “United States Pharmacopeia”
WFI – “Water for Injection”
WHO – “World Health Organization”

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Limites para as determinações analíticas realizadas na água de rinsagem durante a validação de limpeza do fermentador	44
Tabela 2: Composição básica do meio CY utilizado como base para a formulação do meio líquido usado no cultivo da bactéria <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	45
Tabela 3: Contagem de UFC nas placas de Petri do ensaio de quantificação de esporos do bioindicador	51
Tabela 4: Crescimento microbiano nas ampolas de bioindicador utilizadas no ensaio de quantificação de esporos	52
Tabela 5: Crescimento microbiano dos bioindicadores contendo esporos de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	57
Tabela 6: Resultados das determinações dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos realizadas na água de enxágüe final da lavagem do fermentador	60
Tabela 7: Valores médios dos resultados dos parâmetros analisados durante os 13 processos fermentativos com desvio padrão e % do desvio padrão em relação a média	66
Tabela 8: Taxa de crescimento (variação de D.O./h) para cada tempo de cultivo com desvio-padrão e cálculos do limite superior e inferior	69
Tabela 9: Resultado de crescimento microbiano para avaliação da pureza do cultivo final	75
Tabela 10: Resultado de crescimento microbiano para avaliação da inativação da bactéria <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b no fermentador BIostat D 200	76

LISTA DE FIGURAS

Figur

Figura 16: Curva padrão de crescimento bacteriano 64

Figura 17: Gráficos de controle por variáveis, individuais, para cada tempo de cultivo (1 a 10) contendo os valores de taxas de variação de D.O. **Erro! Indicador não definido.**

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	5
II.1 Aspectos importantes da <i>Haemophilus influenzae</i> tipo b	6
II.2 Bio-Manguinhos como produtor de vacinas	8
II.3 A vacina contra Hib	9
II.4 Processos Fermentativos	11
II.4.1 Processo em batelada	11
II.4.2 Processo em batelada Alimentada	12
II.4.3 Processo Contínuo	12
II.5 Considerações sobre Qualidade	14
II.5.1 Garantia da Qualidade e os Produtos Farmacêuticos	15
II.5.2 Qualificação da Instalação e Operação	16
II.5.3 Qualificação de Desempenho do Processo	18
II.5.4 Fundamentos da Validação de processos	19
II.5.5 Tipos de Validação de Processo	24
II.5.6 Gráficos de controle	27
II.5.7 Documentação	28
II.5.8 Revalidação	28
III - MATERIAIS E MÉTODOS	30
III.1 Equipamentos	31
III.1.1 Fermentador	31
III.2 Métodos	33
III.2.1 Determinação de pH	33

III.2.2 Determinação de condutividade	34
III.2.3 Determinação de carbono orgânico total (TOC)	34
III.2.4 Determinação de endotoxina	35
III.3 Procedimento	36
III.3.1 Quantificação do número de esporos no bioindicador utilizado na validação da esterilização	36
III.3.2 Operação e esterilização do fermentador	39
III.3.3 Qualificação térmica e validação do processo de esterilização do fermentador	39
III.3.4 Qualificação térmica do fermentador durante o cultivo e a inativação	41
III.3.5 Limpeza do fermentador	42
III.3.6 Validação do processo de limpeza do fermentador	42
a. Avaliação da necessidade de impregnação do vaso com endotoxina	42
b. Avaliação da Lavagem	43
III.3.7 Processo de fermentação	44
III.3.8 Validação do processo de fermentação	45
IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
IV.1 Quantificação do número de esporos no bioindicador utilizado na validação da esterilização	51
IV.2 Qualificação do fermentador de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B.	52
IV.3 Mapeamento térmico e validação do processo de esterilização do fermentador.	53
IV.4 Mapeamento térmico durante o cultivo e a inativação.	58
IV.5 Validação de limpeza do fermentador de <i>Haemophilus influenzae</i> tipo B.	60
IV.6 Validação do processo de fermentação	62

V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	78
V.1 Conclusões	79
V.2 Sugestões	81
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
VII - APÊNDICE	90
VII.1 Resultados brutos dos parâmetros da fermentação	91

I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Atualmente, quando todos os caminhos levam à busca da qualidade total, torna-se indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação é a ferramenta adequada para garantir a confiabilidade das instalações, dos equipamentos, das utilidades, das metodologias analíticas e, principalmente, dos processos de produção, seja do setor farmacêutico, alimentício, químico ou qualquer outra área onde a qualidade do produto fabricado é uma das principais razões da existência da empresa.

Quando se trata de medicamento ou vacinas, por exemplo, qualquer falha mínima no processo pode acarretar sérios prejuízos à saúde dos consumidores e à idoneidade da indústria no mercado. Nos últimos anos, a exigência dos órgãos regulatórios como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em relação à validação, certificação e qualificação de instalação, equipamento, processo e metodologia analítica, tem aumentado consideravelmente, porém a falta de uma padronização de linguagem do setor cria uma barreira para o entendimento total dos termos (ATHAIDE, 2000).

Assim, validar um processo, equipamento, sistema ou metodologia é tornar legítimo, através do estabelecimento de documentações, tudo que envolve o processo de produção e controle de qualidade, desde as condições do ambiente, até os insumos e matérias-primas que entram em sua composição.

Desta forma, validar significa garantir que o produto seja sempre fabricado da mesma forma, com a mesma qualidade e dentro dos limites de tolerância rigorosamente pré-estabelecidos (ATHAIDE, 2000; MORETTO, 2000; EMANUELLI; SCANDIUZZI, 2000).

De acordo com Moretto (2000), o termo validação foi introduzido nas áreas produtivas a fim de garantir o entendimento do processo de fabricação, assegurando sua execução dentro dos parâmetros estabelecidos de forma a gerar produtos com qualidade consistente.

Define-se como validação de processo o estabelecimento de evidências objetivas de que um processo produz adequadamente um resultado ou um produto que atenda aos requisitos pré-determinados. O objetivo de um sistema da qualidade é dar suporte para que os produtos estejam adequados ao seu uso indicado. A validação de processo é um elemento chave para assegurar que esses princípios e objetivos sejam atendidos.

A realização da validação deve ser executada sempre que: i) de forma direta ou indireta o processo de fabricação tenha sido alterado; ii) quando a qualidade final do produto for duvidosa; iii) em equipamentos novos e iv) em caso de implantação de um processo ou método analítico novo (EMANUELLI; SCANDIUZZI; 2000; PASTEELNICK,1993).

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho não foram encontradas publicações científicas relacionadas à validação de processos fermentativos voltados para indústrias de fabricação de vacinas bacterianas de uso humano.

Desta forma, o objetivo principal deste trabalho foi estudar o processo fermentativo para cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) voltado à obtenção do polissacarídeo a ser utilizado na formulação da vacina contra Hib e, propor e aplicar uma metodologia de validação do mesmo de forma a garantir a sua robustez e a segurança. Para a execução desta validação foi necessário o desenvolvimento e execução de várias etapas de qualificação de equipamentos e validações de processos de apoio. Sendo assim, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Realizar a qualificação de instalação do fermentador BIOSTAT D200 de forma a garantir que todas as utilidades fornecidas se encontram de acordo com o especificado.
- Realizar a qualificação térmica do fermentador nas temperaturas de cultivo e inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b.
- Realizar, através de mapeamento térmico e desafio com bioindicadores, a validação do processo de esterilização do fermentador BIOSTAT D200.
- Validar a limpeza do fermentador utilizando como parâmetros análises físico-químicas e microbiológicas da água de rinsagem final do processo.
- Coletar dados históricos das análises de controle de processo executadas durante os processos fermentativos para servir de base para a validação das etapas do processo fermentativo.

A primeira dificuldade, e talvez a mais forte no desenvolvimento deste trabalho, foi a demora na aquisição dos dados dos processos produtivos já que a geração dos mesmos dependia diretamente da demanda do produto envolvido no estudo. Isto decorre do fato de que Bio-Manguinhos é uma unidade da Fundação Oswaldo Cruz voltada para a produção de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos.

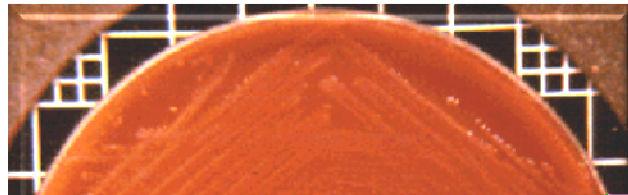
Uma vez que a tecnologia dos processos envolvidos na produção da vacina contra Hib foi adquirida em um acordo formal com uma indústria farmacêutica multinacional, a existência de um termo de sigilo para proteção das informações relacionadas aos parâmetros de processo foi outra limitação para a realização deste trabalho, sendo necessária em diversas etapas, a omissão de certas informações sigilosas.

II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1 Aspectos importantes da *Haemophilus influenzae* tipo b

A bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) é um coco-bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, identificado por Richard Pfeiffer em 1892, que coloniza a nasofaringe dos seres humanos. Meningite é a forma de doença invasiva mais comum causada por Hib e ocorre, principalmente, em crianças menores de 5 anos e adultos em estado imunodeficiente. É de difícil cultivo, passando freqüentemente despercebida nos exames bacteriológicos. Nos cultivos com fatores de crescimento X (hemina) e V (adenosina dinucleotídeo nicotinamida) forma pequenas colônias em forma de gotas de orvalho de brilho azulado (MICHAELS et al., 1976).

Na Figura 1 vemos colônias de *Haemophilus influenzae* tipo b em Agar chocolate.



O *Haemophilus influenzae* tipo b tem demonstrado ser uma importante causa de meningite e a maior causa de pneumonia em crianças. No final da década de 90 estimava-se que esta bactéria seria responsável por no mínimo 6% das Td (n)Tj 7 0 Td (o)

outras doenças graves, é muito provável que estes dados não representem a real incidência da doença invasiva por Hib (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Após a introdução da vacina contra Hib na rede pública em 1999, dados do Ministério da Saúde indicam diminuição dos casos notificados de meningite por Hib. Na década de 90, a média anual foi de 1548 casos. No ano de 2000 este número já havia caído para cerca de 106 em todo o Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000)

As infecções por Hib são a principal causa de meningite em crianças menores de 5 anos de idade. O polissacarídeo (PS) capsular é considerado como o principal fator de virulência deste microrganismo, sendo usado como antígeno para a elaboração da vacina.

II.2 Bio-Manguinhos como produtor de vacinas

Bio-Manguinhos é o maior fornecedor de vacinas do Ministério da Saúde, além de ser o único produtor nacional de imunobiológicos englobando desde vacinas pediátricas tradicionais e vacinas para aplicação em áreas geográficas endêmicas até reagentes e insumos para diagnóstico laboratorial e, desde 2006, biofármacos.

Sua missão é contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, através da pesquisa e da produção de imunobiológicos capazes de atender à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do País.

Desde sua criação, em 1976, Bio-Manguinhos contribui para o esforço nacional de alcançar uma posição de independência na produção das vacinas demandadas. Não menos relevante, tem sido também sua produção, visando o atendimento das necessidades de reagentes para diagnóstico do setor nacional de saúde. Baseada em tais preceitos, a instituição vem construindo uma imagem comprometida com o bem-estar da população e com o avanço da ciência e da tecnologia. Este compromisso tem orientado o esforço do Instituto na busca incessante do desenvolvimento de novos produtos e de novas técnicas.

Desta forma, em 1999, Bio-Manguinhos firmou um contrato de transferência tecnológica com uma indústria farmacêutica multinacional com o objetivo de nacionalizar a vacina contra Hib.

II.3 A vacina contra Hib

A partir dos anos 60, o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra Hib, passou a ser o principal objetivo de alguns centros de pesquisa nos EUA. Estas pesquisas tinham como base experimentos anteriores que utilizaram cápsula polissacarídea para a imunização contra infecções por meningococos e pneumococos (SCHNEERSON et al., 1980, ANDERSON et al., 1989; MOXON, 1991; ELLIS & GRANOFF, 1994).

No início dos anos 70 foi desenvolvida a primeira vacina para a prevenção das doenças provocadas por Hib. Esta vacina era composta basicamente por polissacarídeo capsular purificado (RODRIGUES et al., 1971; ANDERSON et al., 1972; ADAMS et al., 1993). Este polissacarídeo purificado se mostrou eficiente em crianças acima dos 18 meses de idade e, esta vacina foi então aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) (GRANOFF & CATES, 1985; MMWR, 1991; ADAMS et al., 1993).

O polissacarídeo capsular, constituído por unidades repetidas de ribosilribitolfosfato, presente na membrana externa deste microrganismo, é considerado como a principal causa de sua virulência (CRISEL et al., 1975).

Devido a pouca imunogenicidade desta vacina, diversas pesquisas eram realizadas com o intuito de aperfeiçoar este produto tornando-o mais eficiente na imunização. Posteriormente, Schneerson et al. (1980), através de ligação química com uma proteína carreadora, tornou o polissacarídeo mais imunogênico. A vacina produzida com este composto se mostrou eficiente até mesmo em crianças com idade inferior aos 18 meses.

A produção da cápsula polissacarídea está relacionada principalmente com o cultivo do microrganismo. Este cultivo é realizado em escala industrial em fermentadores ou biorreatores onde o controle dos parâmetros críticos tais como pH, temperatura, concentração de O₂ dissolvido e as taxas de transferência de massa e de calor são os principais fatores que determinam a quantidade e qualidade do produto.

Muitos fatores induzem a formação de exopolissacarídeos microbianos, podendo-se citar a limitação de nitrogênio e/ou cátions, variações da temperatura e pH e o aumento da disponibilidade de O₂ (PACE, 1981; WEINER et al., 1995).

Em algumas espécies a síntese deste composto ocorre na fase de aceleração do crescimento estando, portanto, relacionada a este. Para outros microrganismos o início da formação da cápsula polissacarídea ocorre no final desta fase e continua na fase estacionária. Nem todas as linhagens da mesma espécie procedem da mesma forma em relação à síntese de polissacarídeo (SUTHERLAND, 1990). A cápsula polissacarídea de Hib é normalmente produzida na fase de aceleração do crescimento (ANDERSON; SMITH, 1977).

Os biorreatores normalmente utilizados são providos de aeradores, agitadores mecânicos, controladores de pH, temperatura e O₂ dissolvido. A homogeneidade do cultivo é obtida através de agitação adequada, de forma a garantir boa transferência de massa, incluindo o O₂ dissolvido, uma vez que a turbulência promove cisalhamento do ar, aumentando assim a área de contato (PACE, 1981).

A produção de polissacarídeos pode ser conduzida por fermentação em processo por batelada ou contínuo (SUTHERLAND, 1990). Atualmente são produzidos por batelada convencional onde os microrganismos são cultivados sob condições ótimas de consumo de substrato e de formação de polissacarídeo, considerando o rendimento do processo. A produção industrial de polissacarídeo de *Haemophilus influenzae* tipo b é realizada por processo em batelada convencional (KUO, 1980; HILLEMANN et al., 1984; GORDON, 1985; RIENSTRA; SCATTERGOOD, 1991).

Pittman (1935) investigando a influência da agitação, concluiu que quando o cultivo de Hib era mantido estático não havia crescimento microbiano. Normalmente, a fermentação é conduzida sob moderada agitação, variando entre 100 e 200 rpm (KUO, 1980; HILLEMANN et al., 1984; RIENSTRA, 1991). O pH ideal para cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b varia de 7,0 a 7,4 e a temperatura ótima está em torno de 37 °C (JOKLIK et al., 1992) sendo estes parâmetros também utilizados para a produção da cápsula polissacarídea pela maioria dos trabalhos publicados e patentes (KUO, 1980; HILLEMANN et al., 1984; RIENSTRA, 1991).

As informações encontradas em patentes americanas e européias sobre o cultivo de Hib referem-se à realização de cultivos em batelada utilizando biorreatores de 250 L a 800 L de capacidade, com meio composto de peptona de soja e extrato de levedura, com absorbância máxima (600 nm) de 2,80 (RIENSTRA; SCATTERGOOD, 1991; HILLEMANN, 1984).

II.4 Processos Fermentativos

Denominam-se, “fermentadores”, “biorreatores”, “reatores bioquímicos”, ou ainda, “reatores biológicos”, os reatores químicos nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, os quais podem ser enzimas ou células vivas.

A partir do ano de 1950, ocorreu o maior desenvolvimento da área de reatores, o que gerou, desde então, um formidável avanço tecnológico, responsável pelo sucesso de muitos processos fermentativos. Obviamente, em paralelo, houve um desenvolvimento das áreas mais básicas, como por exemplo, a microbiologia destes processos.

Um reator biológico pode ser operado de forma descontínua, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes; semicontínua; descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação celular (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

II.4.1 Processo em batelada

No processo descontínuo simples, ou por batelada, o meio de cultura adequado à nutrição e desenvolvimento do microrganismo de interesse, bem como ao acúmulo do produto desejado, é preparado e colocado em um biorreator (fermentador) onde o microrganismo responsável pelo processo biológico (inóculo) é adicionado e, os parâmetros críticos são controlados até o término do processo. Após um determinado tempo de fermentação, o caldo fermentado do reator é retirado e as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto são realizadas.

Este processo é o mais seguro no que diz respeito à manutenção das condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator é novamente esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, o qual poderá sofrer todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença exclusiva do microrganismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a

fabricação de diferentes produtos, possibilita a realização de fases sucessivas no mesmo recipiente, e dá condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como permite a identificação de todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto.

A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular para a formação de produtos de baixo interesse (CARVALHO; SATO, 2001a).

O biorreator de batelada será sempre usado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas.

II.4.2 Processo em batelada alimentada

O processo de batelada alimentada, também conhecido como Melle-Boinot, é um processo onde o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume total do biorreator.

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo, e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto (inóculo) pode ser de forma contínua ou intermitente.

Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO; SATO, 2001b).

II.4.3 Processo contínuo

O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado.

As principais vantagens do processo contínuo sobre os descontínuos são (EDUARDO, 1991):

- Menores equipamentos;
- Tempo de uso otimizado ou maior capacidade de fermentação com os mesmos equipamentos;
- Rendimento alto;
- Tempo de fermentação e paradas minimizadas;
- Obtenção de caldo fermentado uniforme;
- Menores gastos com mão de obra;
- Maior facilidade no emprego de controles avançados.

Porém, também há desvantagens como:

- Possibilidade de contaminação do cultivo;
- Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas do microrganismo de interesse;
- Possibilidade de seleção de mutantes menos produtivos;
- Dificuldades de operação em estado estacionário.

A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema.

Entretanto, a manutenção de volume constante no reator significa teoricamente a necessidade de se contar com vazões idênticas de alimentação e de retirada de meio, o que é praticamente impossível na prática. Apesar dos problemas acima mencionados, a utilização do processo contínuo de fermentação encontra grande aplicação prática (FACCIOTTI, 2001).

II.5 Considerações sobre Qualidade

Nos últimos anos, com a globalização, as empresas têm presenciado um crescimento sem precedentes do mercado mundial com relação à necessidade de produção de grandes quantidades, e de grande variedade de produtos. Este crescimento se tornou viável com a introdução do conceito de qualidade que dita às exigências em relação ao atendimento da expectativa das legislações específicas e do mercado consumidor.

A amplitude e a complexidade dessas exigências compreendem o espectro total dos problemas gerenciais, tais como: estrutura do preço e redução do custo, relações industriais e desenvolvimento organizacional, mudança tecnológica e mecanização ou venda e introdução de novos produtos. Tudo isto ocorrendo dentro de uma estrutura na qual empresa e governo estão caminhando para relações inteiramente novas (FEIGENBAUM, 1994).

Soluções efetivas para muitos dos problemas atuais não pertencem a questões de gerenciamento tradicional e metodologia da engenharia. Elas são problemas decisivamente importantes quanto ao novo gerenciamento e significado da engenharia, como: gerenciar para garantir produtividade de *todos* na companhia e não apenas da mão-de-obra direta, gerenciar de modo que funcionários, cientistas e engenheiros sejam uma *soma* e não uma *diferença*, gerenciar de modo positivo a aproximação de consumismo, gerenciar lembrando a necessidade de conservação de energia e materiais, com redução de desperdícios e utilização mais adequada dos recursos e gerenciar em termos internacionais e não somente para o mercado nacional, apenas observando outros mercados (FEIGENBAUM, 1994, p. 120).

Assim, em nenhuma outra área a necessidade de aperfeiçoamento se faz mais evidente do que na da qualidade em produtos e serviços em saúde. Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT/NBRISO 9000 (2005), o termo qualidade é definido como a “totalidade de características de uma entidade que lhe confere a capacidade de satisfazer as necessidades explícitas e implícitas”, e para a obtenção da qualidade satisfatória há o envolvimento das fases do ciclo da qualidade como um todo, que são: a qualidade devido à definição das necessidades,

a qualidade devido ao projeto do produto, a qualidade devido à conformidade e a qualidade devido à assistência ao produto ao longo do seu ciclo de vida.

Em 1957 surge o conceito de Controle de Qualidade Total (CQT), criado pelo Dr. Armand V. Feigenbaum, sendo definido como um sistema eficiente que promove a integração do desenvolvimento, da manutenção e do melhoramento de qualidade abrangendo diversos grupos em uma organização permitindo uma produção e serviços mais econômicos, incluindo a preocupação com a satisfação total do consumidor (ISHIKAWA, 1993).

Com a implantação do CQT surge a necessidade de se buscar a Garantia da Qualidade. Uma infra-estrutura apropriada ou “sistema da qualidade”, englobando a estrutura organizacional, os procedimentos, os processos e os recursos e ações sistemáticas precisas para assegurar a confiança necessária de que determinado produto ou serviço satisfaça as exigências quanto à sua qualidade.

II.5.1 Garantia da Qualidade e os Produtos Farmacêuticos

A totalidade das providências tomadas com o objetivo de garantir que os produtos farmacêuticos estejam dentro dos padrões de qualidade exigidos, para que possam ser utilizados para os fins aos quais tenham sido propostos, englobando ainda as questões que individual ou coletivamente influem na qualidade de determinado produto descreve o conceito de Garantia de Qualidade (MORETTO, 1998).

Um programa apropriado de garantia de qualidade, aplicado à fabricação de produtos farmacêuticos, deverá assegurar que:

- Estes produtos sejam projetados e desenvolvidos de forma que levem em consideração as necessidades das Boas Práticas de Fabricação (BPF), Boas Práticas de Laboratório (BPL), Boas práticas Clínicas (BPC), Boas Práticas de Engenharia (BPE).
- As operações de produção e controle sejam claramente especificadas por escrito e que as exigências das Boas Práticas de Fabricação sejam adotadas;
- As responsabilidades gerenciais estejam claramente especificadas na descrição dos serviços;
- Sejam tomadas providências quanto à fabricação, ao suprimento e a utilização correta das matérias-primas e materiais de embalagem;

- Todos os controles necessários sobre as matérias-primas, produtos intermediários, produtos a granel e outros controles em processo, além das calibrações e das validações, sejam realizados;
- Produto acabado seja corretamente processado e conferido segundo procedimentos definidos;
- Os produtos farmacêuticos não sejam vendidos

fim de obter dados básicos e completar seus próprios estudos de qualificação (BIOMANGUINHOS, 2005).

Entretanto, não basta confiar somente nos estudos do fornecedor do equipamento. Cabe ao cliente a responsabilidade final de avaliar, desafiar e testar o equipamento, bem como decidir se é compatível para o uso na fabricação de um dispositivo específico. As avaliações podem resultar em alterações do equipamento ou processo. Tais alterações devem atender aos requisitos do Sistema de Qualidade tais como: Controle de Projeto, Controle de Documentos, Controle de Aquisição, Controle de Processo, Equipamento de Inspeção, Medição e Teste, Validação de Processo e Registro Mestre do Dispositivo.

As qualificações de instalação e operação deverão incluir o estabelecimento de métodos, procedimentos e programações pertinentes para calibração, limpeza e manutenção, além de uma lista de peças sobressalentes para cada parte do equipamento. O planejamento para eventuais manutenção e reparos pode reduzir ou prevenir confusões durante reparos de emergência que podem levar a reparos incorretos, tais como o uso da peça sobressalente incorreta. Os requisitos de limpeza, calibração e reinicialização após o reparo^{do}

alguma alteração no desempenho do equipamento como consequência da mudança. As alterações no desempenho do equipamento deverão ser avaliadas a fim de determinar se é necessário revalidar o processo.

II.5.3 Qualificação de Desempenho do Processo

A finalidade da qualificação do desempenho do processo é testá-lo rigorosamente para determinar se é capaz de produzir efetivamente um resultado que atenda às especificações. Ao se iniciar a fase de validação do desempenho do processo, fica entendido que (FDA, 1987):

- Dispositivo, embalagem e especificações do processo foram estabelecidos, documentados e essencialmente comprovados como aceitáveis através da engenharia, laboratório e outros métodos de verificação;
- Processo, equipamento auxiliares e o meio ambiente foram considerados aceitáveis com base nos estudos de qualificação de instalação e de operação.

Os desafios ao processo deverão simular as situações que serão encontradas durante a produção real. Os desafios deverão incluir as faixas de condições permitidas nos procedimentos de operação padrão e deverão ser repetidos tantas vezes quantas forem necessárias, para assegurar que os resultados sejam significativos e coerentes. Segundo a política interna de Bio-Manguinhos (2005), estudos de validação requerem 3 repetições (3 corridas) e estudos de revalidação somente 1 conjunto de testes (1 corrida).

Os dados do processo e produto deverão ser analisados para determinar qual é a faixa de variação para a saída de processo. Saber qual é a variação da saída é crucial para determinar se um processo está sob controle e é capaz de produzir efetivamente a saída especificada.

Recomendam-se as cartas de controle e gráficos de tendência para estas análises. É importante também que os dados do produto e processo sejam analisados para identificar quaisquer variações são devidas às causas controláveis.

Dependendo da natureza do processo e de sua sensibilidade, as causas controláveis de variação poderão incluir:

- Temperatura

- Umidade
- Variações na alimentação elétrica
- Vibração
- Agentes de contaminação do meio ambiente
- Pureza da água do processo
- Iluminação
- Treinamento inadequado dos funcionários

Medidas adequadas deverão ser tomadas para manter estas causas dentro de determinados limites. Por exemplo, as variações extremas na temperatura podem ser eliminadas pela instalação de aquecedores e ar condicionado. Pode-se aperfeiçoar e realizar o treinamento dos funcionários com maior freqüência, os quais podem ser monitorados mais de perto para assegurar que estão executando corretamente o processo. A eliminação das causas controláveis mais importantes reduzirá a variação na saída do processo e resultará num grau mais elevado de certeza de que a saída atenderá efetivamente às especificações.

Uma vez iniciada a operação de rotina, os dados derivados da monitoração do processo e saída podem ser analisados quanto à variação e comparados com os limites naturais de controle. Estas análises podem detectar o quando a saída do processo está se alterando para que se possam fazer as correções antes, ou logo depois da produção do produto não conforme.

II.5.4 Fundamentos da Validação de processos

A temática da qualidade, segundo Moretto (2000), tem sofrido evolução sem precedentes e reconhece quatro eras: i) era da qualidade da inspeção, ii) era da qualidade do controle estatístico, iii) era da qualidade da garantia e iv) era da qualidade da gestão estratégica (Figura 2). Nos últimos 15 a 20 anos tem sido possível identificar a quinta era da qualidade: era da validação, sendo este trabalho coerente com a mesma.

De acordo com Moretto (1998) a indústria farmacêutica deve se responsabilizar pela qualidade dos seus produtos, assegurando a adequabilidade dos mesmos com relação aos fins para os quais tenham sido produzidos, e cumprir com as exigências relativas ao registro, não colocando os pacientes em risco, em

função de sua inadequabilidade em termos de segurança, qualidade ou eficácia. Assim, para se conseguir alcançar o objetivo da qualidade de forma confiável, é necessário a implantação de um sistema de garantia de qualidade, que incorpore as normas de boas práticas de Fabricação e de Laboratório, no qual os estudos da validação constituem parte essencial destas normas.

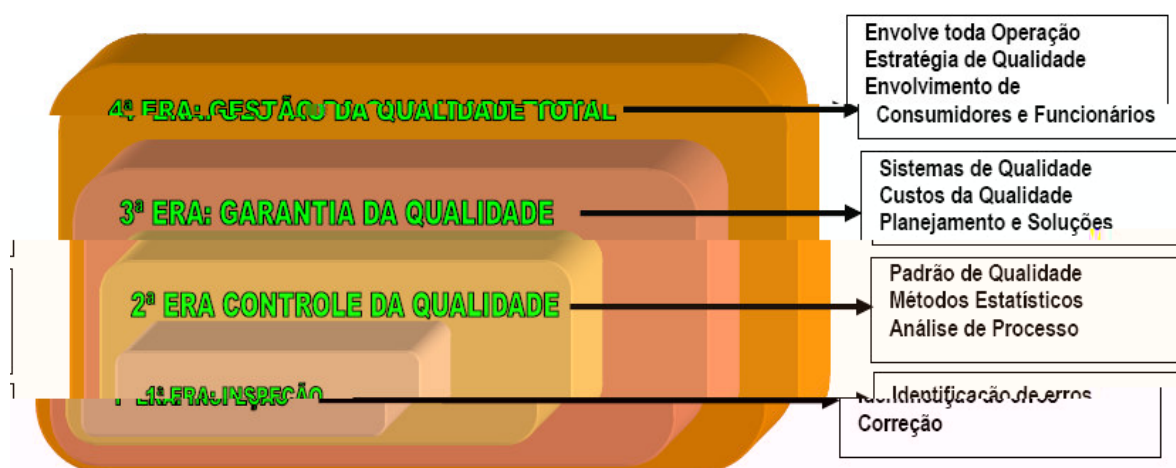


Figura 2: Relação entre as eras da qualidade (MORETTO, 2000)

Segundo Moretto (2000), o primeiro registro que se tem do uso oficial do termo validação, encontra-se nas Good Manufacturing Practices - GMPs, as quais foram publicadas na Food and Drug Administration – FDA (1978), porém somente em 1980 recebeu a seguinte definição: “Validação é o estabelecimento da evidência documentada de que o desenvolvimento de um processo específico permite cumprir com o objetivo para o qual foi desenhado”.

Em 1983, o FDA definiu a validação de processos como “um programa documentado que proporciona um alto grau de segurança de que um processo específico produzirá uma forma farmacêutica que satisfaz as especificações e atributos de qualidade pré-determinados”.

A Validação de processos é uma exigência em empresas de fármacos quando os processos não são totalmente verificáveis, ou seja, não é possível confirmar por meio de inspeção, testes, medição, etc de que os requisitos especificados foram atendidos.

De acordo com as normas NBRISO 9001 (2000) e a NBRISO 13485 (2004), a organização deve validar quaisquer processos de produção e fornecimento de serviço onde a saída resultante não possa ser verificada por monitoramento ou

medição subsequente. Isso inclui quaisquer processos onde deficiências só fiquem aparentes depois que o produto esteja em uso ou o serviço tenha sido entregue.

A ANVISA (2003) com o regulamento RDC210 que dita as Boas Práticas de Fab

medicamentos, foram selecionados adequadamente e encontram-se corretamente instalados, de acordo com as especificações estabelecidas.

➤ **Qualificação de operação:** Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, que o sistema ou subsistema apresenta desempenho conforme previsto, em todas as faixas operacionais consideradas. Todos os equipamentos utilizados na execução dos testes devem ser identificados e calibrados antes de serem usados.

➤ **Validação prospectiva:** A validação prospectiva é um ato documentado, baseado na execução de um plano de testes previamente definidos, que demonstre que um novo sistema, processo, equipamento ou instrumento, ainda não operacionalizado, satisfaz as especificações funcionais e expectativas de desempenho.

➤ **Validação retrospectiva:** Validação retrospectiva é um ato documentado, baseado na revisão e análise de registros históricos, atestando que um sistema, processo, equipamento ou instrumento, já em uso, satisfaz as especificações funcionais e expectativas de desempenho.

➤ **Protocolo de validação:** Documento da empresa específico para cada atividade que descreve os procedimentos a serem realizados na validação, incluindo os critérios de aceitação para a aprovação de um processo de produção ou de parte do mesmo.

➤ **Especificação:** Documento descrevendo em detalhes os requisitos a que devem atender os produtos ou materiais usados ou obtidos durante a fabricação. As especificações servem como base da avaliação da qualidade.

➤ **Relatório de validação:** Documento no qual se encontram reunidos os registros, resultados e avaliação de um processo ou sistema de validação concluído.

➤ **Pior caso:** Conjunto de condições dentro dos limites e circunstâncias permitidos de operação, que apresente a maior possibilidade de falha do processo quando comparados às condições ideais

De acordo com o FDA (1987), há muitas razões para validar processos produtivos. Um fabricante pode assegurar, através de um projeto cuidadoso e de dados de controles de processo, que há uma grande probabilidade de que todos os itens ou lotes produzidos atendem aos requisitos de especificação e têm qualidade uniforme. A dependência de testes do processo e produto terminado pode ser

reduzida. Um processo controlado e validado de forma apropriada resulta em pouco retrabalho e descartes e, por conseqüência, em resultados satisfatórios. Conformidade consistente com as especificações resulta em menos reclamações e *recalls*. Além disso, quando necessário, os registros de validação contêm dados que podem suportar melhorias no processo ou desenvolvimento de sua próxima geração.

Embora os requisitos regulatórios (FDA, WHO, ANVISA) sejam claros quanto à necessidade de validação, há poucos guias específicos de como uma validação deve ser conduzida. Parte desta dificuldade recai sobre a variedade dos processos produtivos, fazendo com que cada um requeira um conjunto de técnicas e ferramentas diferentes.

Toda validação possui objetivos comuns, como o desenvolvimento, entendimento e melhoria dos mesmos. Basicamente, uma validação é composta de três qualificações: instalação, operação e desempenho ou “performance” do processo (neste trabalho, QI, QO e QP respectivamente).

A validação de processo representa a melhor oportunidade para entender o desempenho do processo antes da produção normal de um produto. Através do ganho de conhecimento, vários benefícios são alcançados, tais como: redução da falha de defeitos, redução no tempo de lançamento de um produto, risco mínimo para o consumidor e redução no número de reclamações dos clientes e *recalls* e maximização da satisfação do cliente.

Ingram (2000) lembra que os estudos de validação de processo são conservativos por definição e as chances de aprovação de uma validação não excederá 10% se o desempenho do processo não atender ao mínimo dos critérios de aceitação. De uma forma geral, o processo deve desempenhar-se em níveis muito melhores que o mínimo requerido para ter uma chance razoável de passar nos requisitos de validação.

As ferramentas estatísticas e de qualidade ajudam no alcance destes níveis e auxiliam em duas partes relevantes para que um processo seja validado:

- Prevenção de defeitos através da redução da variação, redução de defeitos e falhas potenciais em níveis aceitáveis daqueles requeridos pelo critério de aprovação da validação;
- Seleção de planos de amostragens que forneçam resultados representativos da qualidade do produto.

Um processo resulta em produtos defeituosos basicamente de duas maneiras: através dos erros de processo, quando o mesmo falha ao desempenhar uma operação; e pela variação de processo, quando as variáveis de controle de processo são determinadas inadequadamente, resultando em variáveis respostas fora dos limites especificados ou com excessiva variação.

II.5.5 Tipos de Validação de Processo

Segundo a ANVISA (2003) e o FDA (1987), a validação do processo pode ser realizada em diferentes momentos durante o ciclo da vida de um produto. Os tipos de validação do processo são definidos levando-se em consideração o momento em que estas são realizadas em relação ao projeto do produto, a transferência do produto para a produção e a liberação do produto para a distribuição.

A validação prospectiva é realizada antes que um produto novo ou um produto existente que tenha sido modificado sejam liberados para a distribuição.

A validação simultânea ou concorrente é uma parte da validação prospectiva realizada com o objetivo de distribuir essencialmente o produto fabricado durante o estudo de validação, sendo praticável quando um teste não destrutivo for adequado para verificar se o produto atende as especificações predeterminadas e aos requisitos de qualidade. Se a validação simultânea foi realizada como validação inicial de um novo processo ou de um processo que tenha sido modificado, a distribuição do produto deverá ficar suspensa até que todos os dados e resultados do estudo de validação tenham sido analisados criticamente e tenha sido determinado que o processo foi corretamente validado.

A validação simultânea pode ser realizada num processo validado anteriormente para confirmar que o processo ainda mantém o *status* validado. Quando não há alterações no processo e há indicação de que ele está operando em estado de controle, o produto poderá ser liberado para distribuição antes que a revalidação do processo seja finalizada. Há certo risco em liberar antecipadamente o produto no caso em que uma análise subsequente dos dados venha mostrar que o processo não mantém o *status* de validado.

A validação retrospectiva é a validação de um processo baseada na produção histórica acumulada, testes, controles e em outras informações sobre um

produto já em produção e distribuição. Este tipo de validação utiliza dados históricos e informações que podem ser encontrados nos registros de produção, dos lotes, resultados de teste e inspeção, reclamações do cliente, em relatórios de falha técnica, de assistência técnica e de auditoria. Os dados históricos deverão conter informações suficientes para fornecer um quadro geral de como o processo está sendo operado e se o produto atendeu devidamente as especificações. A validação retrospectiva talvez não seja possível quando todos os dados necessários não forem coletados, ou ainda quando os mesmos não forem coletados de uma forma que possibilite uma análise adequada.

Quando não há informação suficiente, a possibilidade de execução de uma validação retrospectiva bem sucedida fica comprometida. Alguns exemplos de informações incompletas são:

- As reclamações do cliente que não foram totalmente investigadas para determinar a causa do problema, inclusive a identificação das reclamações ocorridas devido às falhas de processo;
- As reclamações foram investigadas, mas as ações corretivas não foram realizadas;
- As decisões, sobre refugo e retrabalho, não são registradas, investigadas e/ou explicadas;
- Excesso de retrabalho;
- Registros não mostram que o grau de variabilidade está dentro dos índices de variação normal para aquele processo, por exemplo: registrar os resultados dos testes como “passa” ou “não-passa” em vez de registrar as leituras reais ou os resultados das medições perdem dados importantes sobre a variabilidade do processo;
- Lacunas nos registros dos dados sem justificativa.

Se os dados históricos forem definidos como adequados e representativos, poderá ser realizada uma análise para determinar se o processo foi operado em estado de controle e se efetivamente resultou em um produto que atende às especificações predeterminadas e aos atributos de qualidade. A análise deverá ser documentada.

Pode-se utilizar a validação retrospectiva para confirmar que um processo ainda mantém o *status* de validado, uma vez que não foram feitas ^{infra}

- Definição do que constitui uma não-conformidade tanto para

Sempre que houver uma série de observações ou medidas obtidas de um processo tais medidas não serão idênticas entre si (REIS, 2001).

As causas comuns são aquelas que geram uma variabilidade natural, como um ruído de fundo, que atuam sobre o processo sem perturbá-lo, sendo parte inerente do mesmo. Diferentemente, as causas especiais, acrescentam ao processo uma variabilidade inaceitável, geralmente oriunda de três fontes: matéria-prima, equipamentos ou operadores (MONTGOMERY, 2004). Essas causas são fatores geradores de variações que afetam o comportamento do processo de maneira imprevisível, dificultando a obtenção de um padrão.

As causas especiais, diferentemente das comuns, produzem resultados discrepantes em relação aos demais valores, demandando investigação e medidas corretivas. Uma vez encontrada a causa especial, ela deverá ser eliminada.

II.5.7 Documentação

Dentre os requisitos para a validação do processo estão o registro e a documentação da fase de estudo de validação e também da produção de rotina. Os registros das atividades e resultados de validação deverão ser mantidos e devem incluir a data e a assinatura do(s) indivíduo(s) que aprovam a validação e, quando apropriado, o equipamento principal validado. Fazem parte desta documentação os procedimentos para a operação, monitoração e controle de processos.

Um processo validado deverá ser executado somente por pessoas qualificadas. Deverão ser mantidos os registros de monitoração e dos métodos e dados de controle e quando apropriado, do(s) operador(es) que executa(m) o processo, da data de execução e do equipamento principal usado.

II.5.8 Revalidação

O processo não terá de ser revalidado enquanto estiver sob controle e não tiverem ocorrido alterações significativas no mesmo e/ou no produto. O fato de o processo operar sob estado de controle é determinado pela análise rotineira dos dados quanto à conformidade com as especificações e quanto à variabilidade.

Deve-se analisar criticamente o processo no caso de alterações ou desvios e, quando apropriado, efetuar sua revalidação. As atividades de análise crítica,

avaliação e revalidação deverão ser documentadas. A monitoração do processo é um fator importante, pois através dela podem-se identificar alterações indesejadas e considerar a necessidade de revalidação.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Equipamentos

III.1.1 Fermentador

O principal equipamento utilizado no desenvolvimento deste trabalho foi um fermentador da marca B.BRAUN BIOTECH, modelo BIOSTAT D200 mostrado na Figura 3, construído em aço inox do tipo 316L, com 200 L de volume total e 150 L de volume útil.

dreno e um sistema automatizado de controle acoplado ao fermentador que, através de sensores de pressão, temperatura e nível é responsável por conduzir as etapas de limpeza e esterilização do fermentador, controlando o tempo de cada etapa, a entrada de cada utilidade, a temperatura no interior do fermentador e a agitação durante a limpeza.

O fermentador é provido de um controlador com sensores de oxigênio dissolvido, pH e de temperatura que mantém todas as condições necessárias aos processos de fermentação, limpeza, inativação bacteriana e esterilização. Também é equipado com um dispositivo de agitação que tem como principal finalidade garantir a aeração homogênea durante o processo de fermentação. É alimentado com vapor puro e com água para injetáveis, por tubulação em aço inox 316L.

III.1.2 Sistema de aquisição de dados de temperatura

Foi utilizado um sistema para aquisição de dados de temperatura da marca GE Kaye, modelo Validador 2000 (Figura 4).



Este equipamento possui um sistema automático para calibração dos termopares utilizados, o que garante a confiabilidade dos resultados registrados. O sistema também pode ser conectado a um computador pessoal portátil para a sua configuração, calibração dos sensores e para armazenamento dos dados obtidos na validação.

Este dispositivo é utilizado para a validação térmica e foi projetado de forma a atender os requisitos do FDA (2003) relacionados à proteção dos dados quanto à sua alteração ou perda, encontrando-se em conformidade com as exigências internacionais e europeias de Boas Práticas de Fabricação para a inspeção de indústrias de produção de fármacos.

Acoplados ao Validador 2000 foram utilizados sensores de temperatura denominados termopares do tipo T (composto de um filamento de cobre e outro de constantan) da marca GE Kaye modelo Prêmio calibrados no momento anterior ao uso.

III.2 Métodos

III.2.1 Determinação de pH

As amostras para determinação de pH foram coletadas em frascos de vidro com cerca de 30 mL de capacidade. No momento da análise, um volume de 15 mL era transferido para um béquer limpo e rinsado com água para injetáveis (WFI) por 30 segundos.

A determinação do pH das amostras foi executada utilizando-se um medidor de pH da marca Mettler-Toledo, modelo MP230, devidamente calibrado.

O método de determinação de pH de amostras de água foi validado e a incerteza apresentada para o operador em questão foi de 0,09 unidades de pH na faixa de 5,00 a 7,00.

III.2.2 Determinação de condutividade

As amostras para determinação da condutividade foram coletadas em frascos de vidros com cerca de 30 mL de capacidade. No momento da análise, um volume de 15 mL foi transferido para um béquer limpo e rinsado com WFI, por 30 segundos. A determinação da condutividade das amostras foi executada utilizando-se um condutímetro da marca WTN, modelo InoLab level 3, devidamente calibrado.

III.2.3 Determinação de carbono orgânico total (TOC)

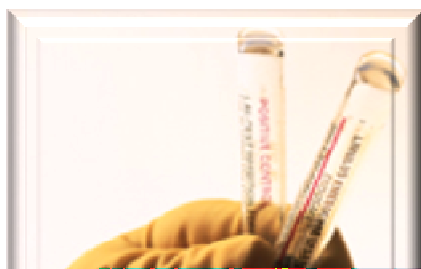
Todas as amostras para as determinações de TOC foram coletadas diretamente em frascos novos, de vidro, de 30 mL de capacidade adquiridos diretamente junto ao fabricante do equipamento, certificados em relação à sua limpeza quanto à concentração de TOC (< 10 ppb ou $\mu\text{g/L}$) e específicos para este tipo de análise, conforme demonstrado na Figura 5 extraída da ficha técnica do produt

O equipamento utilizado foi o analisador de TOC da marca GE Sievers, modelo 800 que utiliza como tecnologia da detecção de TOC a oxidação do carbono orgânico presente na amostra ao CO_2 e a medida deste CO_2 produzida através de uma determinação de condutividade (Figura 6).



O gel-clot é um método qualitativo simples, sendo que a sensibilidade do reagente do lisado de amebócitos do *Limulus polyphemus* (LAL) utilizado foi de 0,125 EU/mL.

Os resultados eram considerados positivos ao apresentar a formação de um gel firme no interior do tubo de reação e considerados negativos se o gel não continuasse firme no fundo do tubo após a inversão do mesmo em 180° (Figura 7).



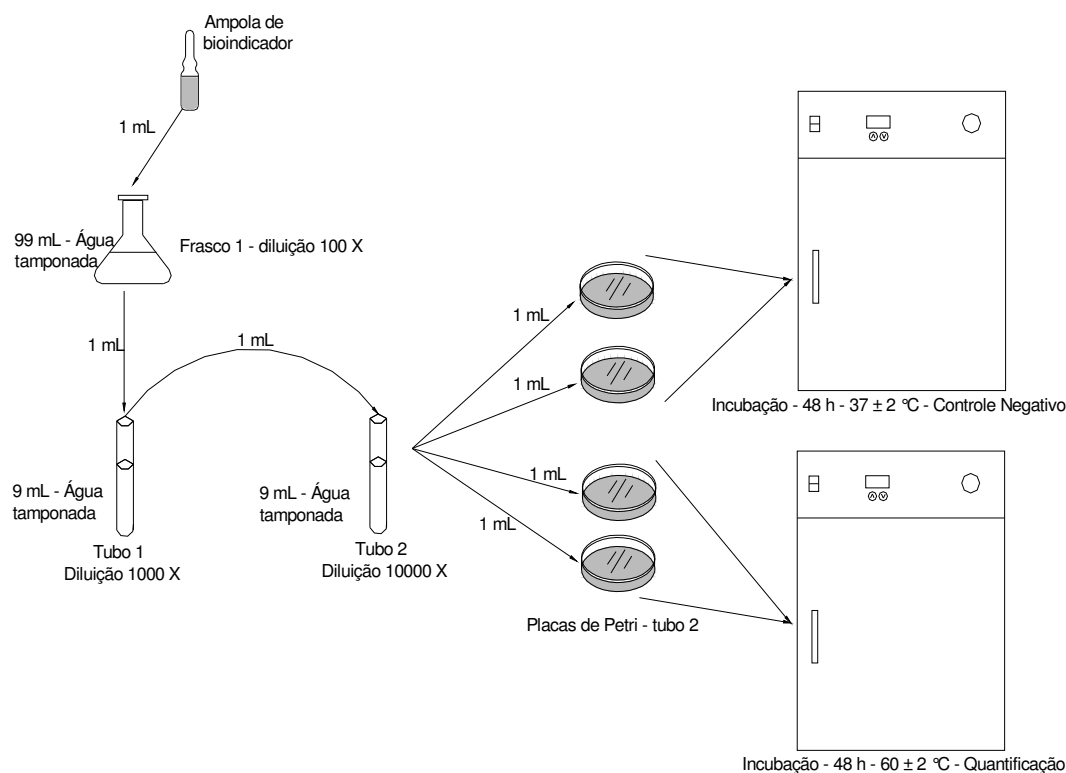


Figura 8: Esquema do procedimento para quantificação do bioindicador tipo ampola contendo esporos de *Geobacillus stearothermophilus*.

O pH foi ajustado para $7,2 \pm 0,2$ com NaOH 10% v/v ou HCl 10% v/v e o volume foi ajustado para 1,00 L com água ultra purificada em balão volumétrico. A solução foi distribuída em frascos Nalgene (cerca de 150 mL por frasco) e foi esterilizada em autoclave por 20 minutos a $121,10 \text{ }^\circ\text{C}$.

Esta água tamponada estéril foi distribuída assepticamente em tubos de polipropileno estéreis de 25 mL e em erlenmeyers estéreis de 250 mL da seguinte forma: 6 tubos contendo 9,0 mL cada e 3 frascos erlenmeyer contendo 99,0 mL, respectivamente.

Foi transferido assepticamente, em uma cabina de fluxo unidirecional, um volume 1,0 mL de cada uma de 3 ampolas de bioindicador contendo o microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* para cada um dos erlenmeyers estéril contendo 99 mL de água tamponada (frascos 1A, 1B e 1C - diluição $10^2 \times$).

As suspensões foram agitadas de forma manual, lentamente, para não afetar a viabilidade das células bacterianas, por cerca de 10 segundos. Foi retirado assepticamente um volume de 1,0 mL de cada uma das suspensões acima para 3 tubos contendo 9,0 mL de água tamponada (tubos 1A, 1B e 1C - diluição $10^3 \times$).

As suspensões foram agitadas manual e lentamente por cerca de 10 segundos. Foi retirado assepticamente um volume de 1,0 mL de cada um dos tubos acima para 3 tubos contendo 9,0 mL de água tamponada (tubos 2A, 2B e 2C - diluição 10^4 x).

As suspensões foram agitadas de forma manual, lentamente por cerca de 10 segundos. Foi transferido de forma asséptica 1,0 mL da suspensão de cada um dos tubos 2A, 2B e 2C para cada uma de 4 placas de Petri previamente identificadas contendo meio de cultivo Agar Casoy.

A suspensão foi espalhada sobre o meio com o auxílio de uma alça de Drigalski para espalhamento de células.

As placas foram invertidas e incubadas por 48 horas, sendo duas à $37,0 \pm 2,0$ °C (controle negativo) e duas à $60,0 \pm 2,0$ °C.

Juntamente com as placas, foram incubadas pelo mesmo período de tempo uma ampola intacta à $37,0 \pm 2,0$ °C (controle negativo) e uma ampola intacta à 60 °C ± 2 °C (controle positivo).

Após o período de incubação, foram contadas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de todas as placas.

Para o bioindicador ser aprovado para uso nas validações dos processos de esterilização em Bio-Manguinhos os seguintes resultados devem ser encontrados:

➤ As placas incubadas a $37,0 \pm 2,0$ °C não devem apresentar crescimento, assim como a ampola incubada na mesma temperatura deve permanecer com uma coloração rosácea;

➤ As placas incubadas a $60,0 \pm 2,0$ °C devem apresentar crescimento e a ampola controle deve apresentar coloração amarela após o tempo de incubação. Esta mudança de coloração ocorre devido à formação de ácido como resultado da fermentação do açúcar do meio de cultura. A ampola de controle também pode se tornar turva devido ao crescimento bacteriano.

➤ A partir das contagens de UFC das placas incubadas a $60,0 \pm 2,0$ °C a concentração de esporos média nas ampolas, após as devidas correções em relação às diluições utilizadas, deve estar na faixa de $2,5 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, o que representa, respectivamente, $5,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^7$ UFC/ampola uma vez que cada ampola possui 2 mL.

III.3.2 Operação e esterilização do fermentador

O fermentador foi esterilizado com vapor d'água puro fluente através de um sistema de SIP ("steam in place") acoplado ao equipamento. O vapor utilizado foi gerado a partir de água para injetáveis fornecida a um gerador de vapor puro da marca Stilmas modelo 155 DST.

O sistema de controle automatizado controlou a entrada de vapor no tanque e nas tubulações do fermentador através da abertura e fechamento da válvula de entrada desta utilidade de forma a manter constante a temperatura de 121,10 °C por um tempo de 20 minutos.

Após o tempo de exposição, todas as válvulas foram automaticamente fechadas pelo controlador do fermentador de forma a manter a sua estanqueidade e esterilidade até a adição do inóculo.

III.3.3 Qualificação térmica e validação do processo de esterilização do fermentador

A qualificação térmica do fermentador e a validação do processo de esterilização têm como objetivo garantir a esterilidade do interior do fermentador de forma a minimizar a probabilidade de contaminação do cultivo a ser realizado.

Durante a validação do processo de esterilização foram realizadas três corridas de mapeamento térmico do interior do vaso do fermentador BIOSTAT D200 utilizando 11 termopares do tipo T (cobre e constantan) codificados como S01 a S11 e conectados a um sistema de aquisição de dados da marca GE modelo Validador 2000.

O Validador 2000, além de monitorar todo o ciclo em relação à temperatura realiza automaticamente os cálculos de F0 para cada sensor utilizado na validação de ciclos de esterilização. Este valor de F0 é determinado em minutos e está relacionado com a capacidade do ciclo de esterilização, a uma temperatura de 121,10 °C, de atingir a probabilidade de sobrevivência alvo do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* numa concentração inicial de cerca de 10⁶ esporos de bioindicador por ampola.

Como foi utilizado na validação o método d3/01a

lizaga3@T178046
ãlii añ01d :72397 s

Ao término do período de incubação os bioindicadores foram verificados quanto à alteração da coloração do seu meio de cultivo. Desta forma, os bioindicadores com coloração rosácea foram considerados negativos em relação ao crescimento microbiano e os com coloração amarelada, considerados positivos (Figura 10).



III.3.5 Limpeza do fermentador

Após o processo fermentativo o fermentador foi drenado e o resíduo da fermentação foi deixado em contato com as superfícies internas do equipamento por um período de 48 h. Normalmente, o fermentador é limpo no dia seguinte ao processo de fermentação, porém, durante a validação, foi utilizado um tempo de 48 h de contato com o resíduo de forma a dar uma margem de segurança em relação ao tempo usual (pior caso).

O fermentador foi rinsado inicialmente com água deionizada fluente por período de 15 minutos, sendo então drenado. Foi posteriormente enchido com 150 L de água para injetáveis (WFI) quente quando foram adicionadas 3,0 Kg de NaOH de forma a preparar uma solução 0,5 mol/L dentro do próprio fermentador, conforme descrito no procedimento interno de Bio-Manguinhos (DI 1114, 2005).

O agitador do equipamento foi ligado a uma velocidade de 150 rpm por 15 minutos. O equipamento foi drenado totalmente e foi realizada uma rinsagem final com WFI quente por 20 minutos e ao término da rinsagem o equipamento foi novamente drenado.

III.3.6 Validação do processo de limpeza do fermentador

a. Avaliação da necessidade de impregnação do vaso com endotoxina

Durante a validação de limpeza, há a necessidade de se demonstrar uma redução de 1000 vezes na concentração de endotoxina contida no material a ser limpo. Desta forma, como a água de rinsagem final tem como limite de endotoxina a concentração de 0,25 EU/mL, é necessário que se faça uma avaliação se o material por si só já possui uma concentração igual ou superior a 250 EU/mL.

Após contato do resíduo da fermentação com as superfícies internas do equipamento por 48 h o mesmo foi cheio com 150 L de água para injetáveis (WFI) e o sistema de agitação foi ligado a 150 rpm por 15 minutos.

Após agitação, foi coletado através da válvula de amostragem, um volume de 35 mL para avaliação da concentração de endotoxina. A avaliação da

concentração de endotoxina foi realizada através da metodologia de Gel Clot, sendo que o reagente utilizado foi um LAL com sensibilidade de 0,125 EU/mL.

Se a amostra recolhida apresentasse uma concentração ≥ 250 EU/mL não existiria a necessidade de impregnação do fermentador com solução preparada em laboratório e, o próprio contaminante do processo permitiria a validação da limpeza do fermentador.

Este procedimento foi realizado em cada uma das 3 corridas de validação de limpeza do fermentador.

b. Avaliação da Lavagem

Como o fermentador BIOSTAT D200 é um vaso, de aço inox 316 L, com acabamento sanitário, eletropolido, e a sua limpeza é realizada através de circulação da solução de lavagem e da água de rinsagem com o uso de “spray ball”, não foram localizados pontos considerados “mortos” onde haveria a possibilidade de depósito, precipitação e aderência de resíduos. Sendo assim não houve a necessidade de uso de “swabs” para coleta de amostras de pontos de difícil acesso e limpeza e, o método utilizado para validação de limpeza foi o de avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água de rinsagem final.

Ao término da lavagem, o fermentador foi cheio com 150 L de WFI, e, após agitação a 150 rpm por 15 minutos, a água de rinsagem final foi coletada em dois frascos (Amostras A), sendo um frasco apirogênico, de polipropileno (cerca de 35 mL) e o outro de vidro, indicado para os testes de determinação de TOC, pH e condutividade (30 mL).

A água WFI foi coletada diretamente nas suas tubulações específicas em dois frascos (Amostras B), sendo um frasco apirogênico, de polipropileno (cerca de 35 mL cada) e o outro de vidro indicado para os testes de determinação de TOC, pH e condutividade. Esta WFI serve como controle das análises realizadas na água de rinsagem.

Foram realizadas nas amostras A e B os testes para determinação de TOC, pH, condutividade e concentração de endotoxina.

O procedimento acima foi realizado três vezes consecutivas para gerar um relatório de validação. Para que este processo fosse considerado validado, além de se demonstrar a redução de 1000 X na concentração inicial de endotoxina, os resultados de análise nas amostras de recuperação, água de rinsagem final e água WFI deveriam obedecer aos limites especificados na Tabela 1 (FARMACOPÉIA AMERICANA - USP XXVII, 2001).

Tabela 1: Limites para as determinações analíticas realizadas na água de rinsagem durante a validação de limpeza do fermentador

Parâmetro Testado	Água de Rinsagem Final e WFI	Amostra de Recuperação
pH	5,00 a 7,00	NA
Condutividade à 25°C(μS/cm)	< 2,10	NA
TOC (μg/L)	< 500	NA
Concentração de Endotoxina (EU/mL)	< 0,250	≥ 250

NA: não se aplica

III.3.7 Processo de fermentação

O meio de cultivo líquido utilizado no fermentador foi baseado no meio CY descrito na literatura (MERRITT, 2000) que possui os seguintes componentes: extrato de levedo, ácido casamínico, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ mono hidratado, cloreto de hemina, NAD e dextrose. A composição do meio CY básico está demonstrada na Tabela 2.

O meio líquido modificado foi preparado e transferido para o interior do fermentador onde foi esterilizado através da injeção de vapor puro fluente fornecido pela estação SIP acoplada ao equipamento.

Após a esterilização do meio foi realizada, sob condições assépticas, a inoculação do fermentador com o conteúdo de cinco frascos erlenmeyer de um pré-cultivo realizado a 36,0 °C ± 1,0 °C por 16 ± 4 h de bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b. A cepa cultivada foi obtida no banco de células de Bio-Manguinhos.

O processo de fermentação foi conduzido em condições de estanqueidade, sendo que o controlador automatizado do fermentador BIOSTAT D200 manteve as

condições pré-determinadas no procedimento interno DI 1129 (2005). A agitação foi mantida entre 50 e 160 rpm, a temperatura em $36,0 \pm 1,0$ °C por aquecimento elétrico, a taxa de oxigênio dissolvido a 25 % de saturação através de aeração e agitação e, o pH mantido em torno de 7,2 pela adição de solução de NaOH 5,0 mol/L estéril durante todo o processo de fermentação.

Tabela 2: Composição básica do meio CY utilizado como base para a formulação do meio líquido usado no cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b

Componentes do Meio CY	Concentração (g/L)
Extrato de levedo	5,0
Ácido casamínico	10,0
Na ₂ HPO ₄	12,4
NaH ₂ PO ₄ mono hidratado	1,8
Cloreto de hemina	0,04
NAD	0,02
Dextrose	10,0

Após o tempo de fermentação o processo foi interrompido e foi iniciado o processo de inativação bacteriana a $56,0 \pm 1,0$ °C por 12 minutos.

III.3.8 Validação do processo de fermentação

O objetivo da validação do processo de fermentação é demonstrar que o mesmo é capaz de gerar um produto nas condições desejadas e que o mesmo se mantém constante em relação à cinética de crescimento da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b.

Esta etapa foi realizada em paralelo com o processo fermentativo real onde foi monitorado o parâmetro absorvância (D.O.) a 650 nm ao longo do tempo de fermentação, que foi utilizado como base para a avaliação do perfil cinético de crescimento microbiano.

Amostras de 5 mL foram coletadas assepticamente, a cada 1 hora após início do processo até o tempo final de 10 horas, em frascos de polipropileno estéreis de 35 mL de capacidade através da válvula de amostragem previamente esterilizada por vapor fluente.

As D.O. das amostras diluídas foram medidas em espectrofotômetro da marca Beckman, a 650 nanômetros, sendo que o branco utilizado foi o meio de cultivo estéril sem a presença de microrganismos.

Os dados de D.O. foram registrados nos protocolos de produção e analisados posteriormente.

Foram selecionados 13 lotes de fermentação e os dados de controle registrados pelos operadores da produção foram avaliados em relação à sua conformidade.

Para cada lote selecionado foram calculadas as taxas de variação da absorbância durante o processo fermentativo em função do tempo. Esta taxa foi chamada de taxa de crescimento (TX_{cr}). Estas taxas foram calculadas em variações de tempo de 1 hora até a finalização do processo de cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b em 10 horas. A fórmula utilizada para a obtenção desta taxa está descrita na Equação 1.

$$TX_{cr} = \frac{D.O.t - D.O.t_0}{t - t_0} \quad (1)$$

Legenda: D.O.t = absorbância no tempo de interesse
D.O.t₀ = absorbância no tempo inicial
t = tempo de interesse
t₀ = tempo inicial = 0

Os dados de cinética de crescimento serviram de base para a elaboração de cartas-controle e gráficos de amplitude móvel com n=2, de forma a avaliar a presença de tendência nos dados históricos.

O gráfico de controle permite verificar se a dispersão observada no processo é aceita como sendo estável. Para isso, foi preciso calcular os limites superiores e inferiores a serem representados nestes. Nos gráficos de controle foram representados 3 limites superiores e 3 limites inferiores divididos em zonas A, B e C. Os limites superior e inferior das zonas A, B e C foram determinados somando-se ou diminuindo-se a taxa média de crescimento de cada tempo com 3, 2 ou 1 desvio-padrão, respectivamente.

A presença de pontos fora dos limites da zona A indicariam, em princípio, que a variabilidade do processo está acima do indicado. Entretanto, neste caso, foi

prevista uma verificação da possibilidade de haver influências como troca de operador, erros na medição ou na calibração dos instrumentos.

Além da construção dos gráficos de controle, foi realizada uma análise em relação à apresentação de algum tipo de tendência ou causa especial de acordo com a Figura 11.

Causa especial é definida como quaisquer fatores detectáveis e identificáveis que contribuem para a variação do processo de modo imprevisível e afetam a sua uniformidade (norma ABNT NBR 11469, 1990).

Para que se possa considerar o processo de fermentação sob controle estatístico, os resultados de análise das taxas de crescimento por gráfico de controle não devem apresentar tendência. Caso contrário deve-se verificar se houve justificativa pertinente que não comprometesse a qualidade do produto.

Além dos dados de cinética, foram avaliados os parâmetros de pureza de cultura e de inativação da bactéria. Para avaliação da pureza do cultivo, ao final do processo fermentativo, foi coletada em frasco estéril de 20 mL, através da válvula de amostragem sanitária, previamente esterilizada por 20 minutos com passagem de vapor fluente, uma amostra de cerca de 10 mL do interior do fermentador. Desta amostra, foi semeado 1,0 mL em cada uma de 3 placas de Petri contendo o meio Agar Casoy e foram inoculados 1,0 mL em cada um de 3 frascos contendo 100 mL de meio de cultivo caldo Tioglicolato e 0,5 mL em cada um de 3 frascos contendo 50 mL de meio de cultivo caldo caseína. A semeadura em Agar Casoy e o inóculo em caldo caseína foram incubados a $22,5 \pm 2,5$ °C por 120 h e 14 dias, respectivamente, enquanto que o inóculo em caldo Tioglicolato a $32,5 \pm 2,5$ °C por 14 dias.



Figura 11: Testes para identificação de causas especiais em gráficos de controle (Fonte: NBR 11469, 1990)

LSC – Limite Superior de Confiança

LIC – Limite Inferior de Confiança

\bar{X} – Média

Para que o processo fosse considerado satisfatório, sem contaminação, nenhum destes meios inoculados deveria apresentar crescimento após o período de incubação.

Para avaliação da inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, ao final do processo, foi coletada em frasco estéril de 10 mL, através da válvula de amostragem sanitária, previamente esterilizada por 20 minutos com passagem de vapor fluente, uma amostra de cerca de 5 mL do interior do fermentador. Desta amostra, foi semeado 0,2 mL em cada uma de 2 placas de Petri contendo o meio Agar chocolate e foi inoculado 1,0 mL em erlenmeyer contendo 100 mL do meio líquido de cultivo de Hib. As amostras foram incubadas a 36 ± 1 °C por 48 h sendo que o erlenmeyer permaneceu sob agitação de 150 rpm. Para que a inativação fosse considerada satisfatória, nenhuma destas amostras deveria apresentar crescimento após o período de incubação.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1 Quantificação dos esporos no bioindicador utilizado na validação da esterilização

Na Tabela 3 estão registradas as contagens de UFC obtidas no ensaio de quantificação de esporos do bioindicador contendo *Geobacillus stearothermophilus*.

Tabela 3: Contagem de UFC nas placas de Petri do ensaio de quantificação de esporos do bioindicador

	Diluição de 10.000 X – Incubação a 60 °C		Diluição de 10.000 X – Incubação a 37 °C	
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
Ampola 1 (UFC)	109	116	0	0
Ampola 2 (UFC)	105	116	0	0
Ampola 3 (UFC)	124	112	0	0
Média Global				

Este fato indica que as ampolas não estão contaminadas com outro microrganismo, que as soluções e frascos utilizados no ensaio de quantificação se encontravam estéreis e que a técnica de quantificação foi realizada de forma adequada sem proporcionar a contaminação das amostras.

A Tabela 4 descreve os resultados da incubação direta das ampolas nas temperaturas de 60 e 37 °C.

Tabela 4: Crescimento microbiano nas ampolas de bioindicador utilizadas no ensaio de quantificação de esporos

Bioindicador	Coloração do bioindicador após incubação	
	Incubação a 60 °C	Incubação a 37 °C
Ampola 1	Amarela (+)	Rosácea (-)
Ampola 2	Amarela (+)	Rosácea (-)
Ampola 3	Amarela (+)	Rosácea (-)

A Tabela 4 indica que nenhuma ampola de bioindicador incubada a 37 °C apresentou coloração amarela após o período de incubação o que demonstra que não houve crescimento microbiano. Este resultado confirma o fato de que os bioindicadores deste lote não apresentavam contaminação por outro tipo de microrganismo. Além disso, todos os bioindicadores incubados a 60 °C apresentaram coloração amarela, indicando crescimento microbiano do mesmo. Isto demonstra que, havendo esporos viáveis de *Geobacillus stearothermophilus* no interior das ampolas o meio de cultivo é capaz de alterar sua coloração e indicar o crescimento deste microrganismo o que descarta a possibilidade de resultado falso negativo. Sendo assim, este ensaio de quantificação foi considerado aprovado e o lote do bioindicador foi liberado para uso.

IV.2 Qualificação do fermentador de *Haemophilus influenzae* tipo B.

Os equipamentos críticos aos processos de produção de vacinas devem ser qualificados quanto à sua instalação, operação e desempenho.

No caso do fermentador, foi verificado que o mesmo estava instalado de acordo com as suas especificações descritas no manual técnico, sendo que todas as

utilidades fornecidas ao equipamento, tais como rede elétrica, vapor puro, ar comprimido seco, água deionizada e água para injetáveis encontravam-se com a qualidade mínima requerida e com as especificações de vazão, pressão e tensão atendidas.

Segundo a Anvisa (2003), todos os equipamentos críticos aos processos de produção devem ser qualificados quanto à sua instalação e operação antes da execução da validação dos processos que são realizados no referido equipamento.

Desta forma, após a conclusão da qualificação de instalação do fermentador com resultados satisfatórios pudemos prosseguir com qualificação térmica do equipamento.

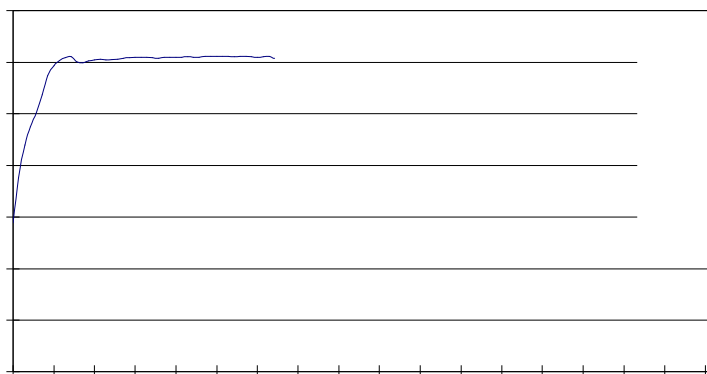
IV.3 Mapeamento térmico e validação do processo de esterilização do fermentador.

Os resultados da qualificação térmica do fermentador durante o processo de esterilização do mesmo com vapor puro estão demonstrados nos três gráficos da Figura 12.

Nos gráficos correspondentes às três corridas realizadas para mapeamento térmico do processo de esterilização do fermentador pode-se observar que a temperatura aumentou, nos 11 pontos monitorados no interior do vaso, de cerca de 20,00 °C (temperatura ambiente da sala onde está localizado o fermentador) até a estabilização acima dos 121,10 °C. Esta estabilização da temperatura durou cerca de 7 minutos e apresentou apenas duas oscilações iniciais.

Segundo a ISPE (2001), durante a validação de sistemas automatizados, o sinal avaliado, neste caso a temperatura, não deve possuir mais de 5 oscilações até a sua estabilização e, o sistema de controle deve ser capaz de manter o sinal estável. Nas três corridas realizadas, esta temperatura de 121,10 °C se manteve constante por um período que variou de 20 a 25 minutos.

Nos 30 minutos subseqüentes a temperatura foi gradualmente diminuindo em decorrência da finalização do ciclo de esterilização e interrupção do fornecimento de vapor puro ao sistema. Esta etapa não foi monitorada até a temperatura ambiente (20 °C) uma vez que não é crítica ao processo de esterilização.



Pode-se observar que os 11 termopares do tipo T posicionados no interior do vaso seguiram o mesmo perfil qualitativo de variação de temperatura em função do tempo. As únicas variações significativas foram observadas durante o resfriamento do sistema o que é consequência do resfriamento natural do mesmo.

Estes resultados indicam que o fermentador BIOSTAT D200 foi capaz de controlar de forma eficiente o processo de esterilização por vapor puro uma vez que a temperatura se manteve constante e próxima aos 121,10 °C durante o 20 minutos necessários ao processo.

A partir dos dados obtidos no Validador 2000 foram calculados os valores de F0 para cada sensor o que está demonstrado na Figura 13.

De acordo com a norma NBR ISO 11134 (2001) que especifica requisitos para o uso do calor úmido no desenvolvimento do processo de esterilização, durante a validação e no controle da rotina de esterilização, o valor mínimo de F0 calculado para o uso da metodologia de “overkill” na esterilização por vapor saturado deste lote de bioindicador foi de 16 minutos.

Nos gráficos de F0 pode-se observar que os valores variaram entre 23,00 e 34,00 minutos nas três corridas de mapeamento térmico. Esta variação é resultante dos diferentes tempos de exposição e as variações de temperaturas em relação à localização dos termopares.

Como o critério de aceitação definido foi a obtenção de valores de F0 acima de 16 minutos para todos os termopares, pode-se concluir que, apesar da variação observada, os resultados se mantiveram dentro do esperado o que indica que em todos os locais ocorreram as condições mínimas necessárias à esterilização.

Este fato pode ser confirmado na Tabela 5 que descreve os resultados obtidos com os bioindicadores contendo o microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* que foram posicionados nos mesmos locais dos termopares.

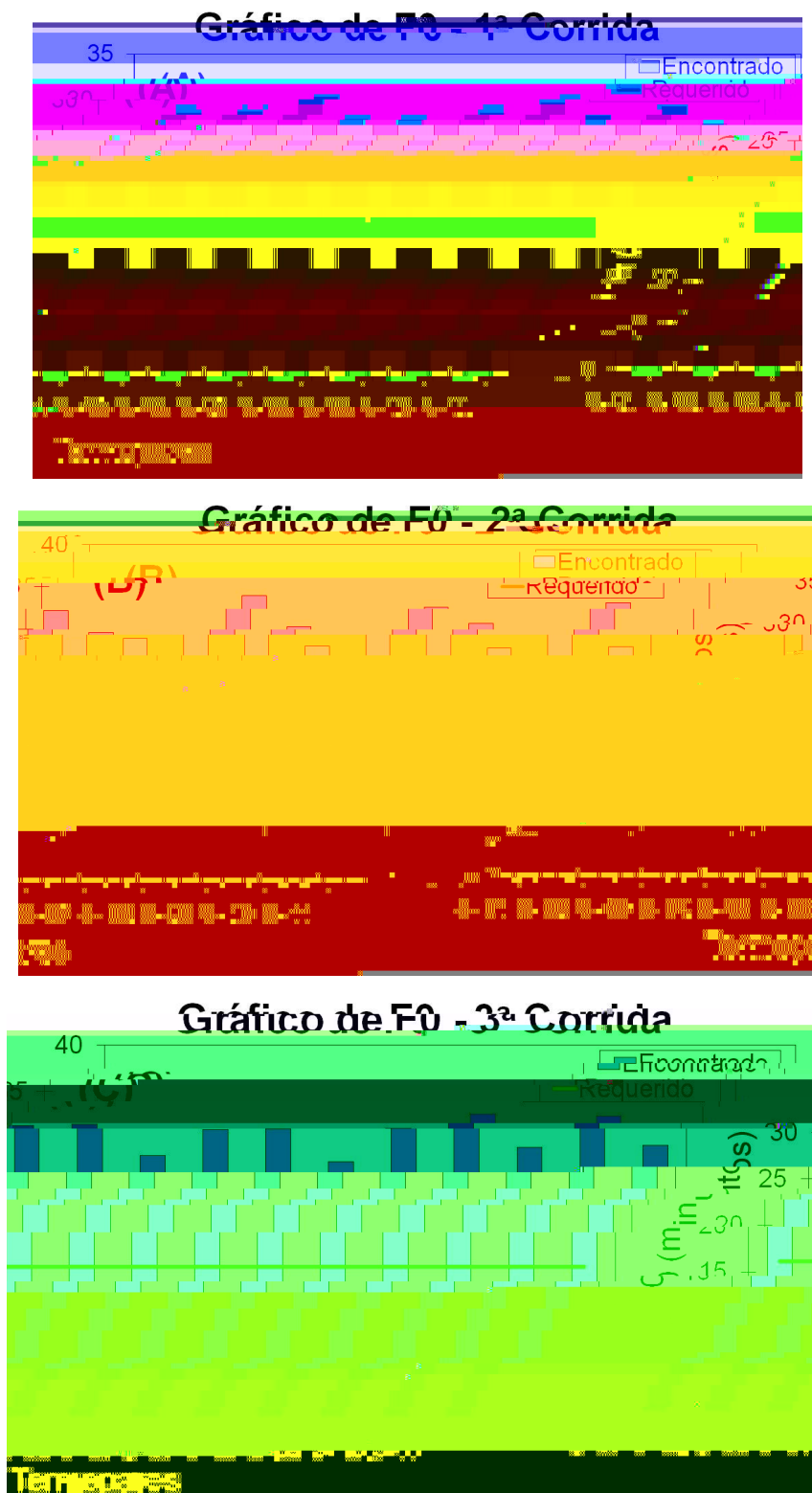


Figura 13: Gráficos de F₀ calculados pelo Validador 2000 durante o processo de esterilização do fermentador BIOSTAT D200. (A): 1ª corrida de validação, (B): 2ª corrida de validação e (C): 3ª corrida de validação.

Tabela 5: Crescimento microbiano dos bioindicadores contendo esporos de *Geobacillus stearothermophilus*

Coloração do bioindicador após incubação			
Bioindicador	1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
C(+)	Amarela (+)	Amarela (+)	Amarela (+)
B1	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B2	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B3	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B4	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B5	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B6	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B7	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B8	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B9	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B10	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)
B11	Rosácea (-)	Rosácea (-)	Rosácea (-)

C(+) – controle positivo

B1 a B11 – bioindicadores distribuídos no fermentador

A Tabela 5 indica que nenhum dos bioindicadores, com exceção do controle positivo que corresponde a uma ampola de bioindicador que não foi exposta ao processo de esterilização, apresentou coloração amarela após o período de incubação a 56°C o que demonstra que não houve crescimento microbiano. Com isso, foi confirmado que, além de gerar valores de F0 acima do requerido, o processo de esterilização do fermentador foi eficiente no que diz respeito à destruição do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* numa população de aproximadamente $2,28 \pm 0,14 \times 10^6$ esporos.

Segundo a RDC 210 (2003), todo o processo de esterilização por calor úmido deve ser monitorado com o uso de indicadores biológicos apropriados e estes bioindicadores não devem apresentar crescimento após exposição ao processo de esterilização. Segundo os resultados de quantificação de esporos, o valor de F0 mínimo calculado para este lote era de 16 minutos o que foi confirmado pela ausência de crescimento dos bioindicadores após o período de incubação.

IV.4 Mapeamento térmico durante o cultivo e a inativação.

Os resultados dos mapeamentos térmicos do fermentador nas etapas de cultivo e de inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b estão apresentados na Figura 14.

Os gráficos das três corridas realizadas para mapeamento térmico durante as etapas de cultivo e inativação bacteriana demonstram um período de cerca de 10 minutos para a subida da temperatura desde 8 °C até a sua estabilização em 36,5 °C nos 10 pontos monitorados no interior do vaso. Esta estabilização da temperatura apresentou 4 oscilações e foi demonstrado no gráfico um período de estabilidade de pelo menos 40 minutos.

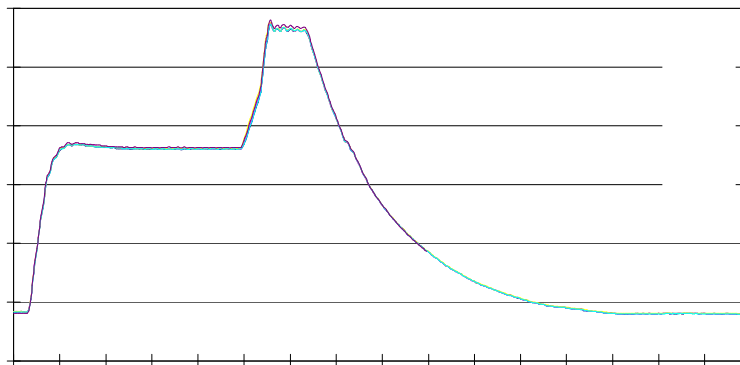
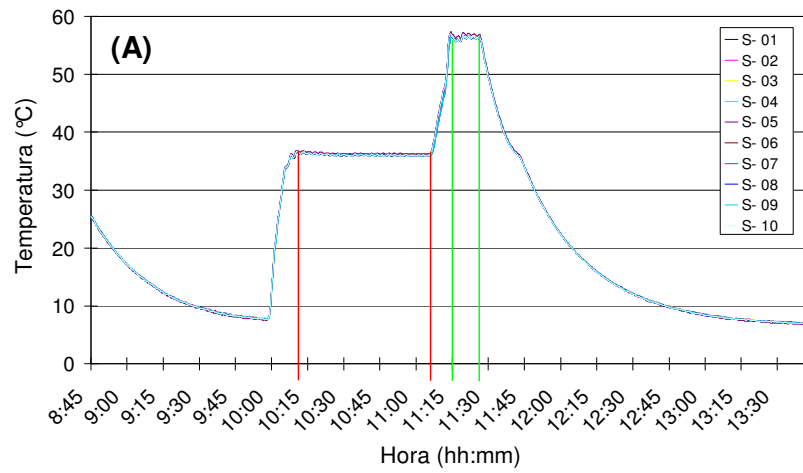
No caso da temperatura mínima de inativação a 56°C, o sistema também levou cerca de 10 minutos até a sua estabilização a partir da temperatura de 36,5°C, se mantendo sempre superior e estável, nos 10 pontos monitorados, por um período de aproximadamente 12 minutos.

Nos 120 minutos seguintes a temperatura foi gradualmente diminuindo em decorrência da finalização do ciclo de inativação e interrupção do fornecimento de vapor puro ao sistema. Esta etapa foi monitorada até a temperatura inicial em torno de 8°C.

Pode-se observar que os 10 termopares tipo T posicionados no interior do vaso seguiram o mesmo perfil qualitativo de variação de temperatura em função do tempo. Estes resultados indicam que o fermentador BIOSTAT D200 foi capaz de controlar de forma eficiente as condições de temperatura necessárias às etapas de cultivo e inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b uma vez que a temperatura se manteve constante próxima aos 36,5°C durante uma simulação do processo fermentativo com duração de 40 minutos e acima dos 56°C por um período mínimo de 12 minutos.

Segundo a ISPE (2001), durante a validação de sistemas automatizados, o sinal avaliado, neste caso a temperatura, não deve possuir mais de 5 oscilações até a sua estabilização e, o sistema de controle deve ser capaz de manter o parâmetro estável pelo período necessário ao processo em questão.

Monitoramento de Temperatura - 1ª Corrida



IV.5 Validação de limpeza do fermentador de *Haemophilus influenzae* tipo B.

Os resultados dos parâmetros avaliados durante a validação de limpeza do fermentador estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das determinações dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos realizadas na água de enxágüe final da lavagem do fermentador

Parâmetro Testado	Requerido	Real		
		1ª corrida	2ª corrida	3ª corrida
pH	5-7	5,58	6,50	6,58
Condutividade à 25°C(μS/cm)	<2,1	0,67	0,91	0,92
TOC (μg/L)	<500	165	159	130
Concentração de endotoxina (EU/ml)	<0,250	<0,250	<0,250	<0,250
Redução de Endotoxina (log)	≥3	≥3	≥3	≥3

Os estudos de validação de limpeza utilizando parâmetros físico-químicos e microbiológicos pode ser útil na avaliação da presença de resíduos do processo ou do agente de limpeza utilizado.

Neste processo, a água de enxágüe final utilizada foi a WFI. Portanto, de acordo com a Farmacopéia Americana USP XXVII (2001), os limites estabelecidos para estes parâmetros são: pH 5,0 a 7,0, condutividade $\leq 2,1$ μS/cm, TOC < 500 ppb ou μg/L e concentração de endotoxina < 0,25 EU/mL.

Conforme demonstrado na Tabela 6, o valor do pH variou de 5,58 a 6,58, a condutividade de 0,67 a 0,92 μS/cm, o TOC entre 130 e 165 ppb, a concentração de endotoxina sempre abaixo de 0,25EU/mL com uma redução sempre igual ou superior a 3 log (1000X).

Todos estes resultados obtidos se encontraram dentro dos limites especificados na USP XXVII para WFI. Além disso, foi demonstrado que o próprio processo de fermentação utilizado foi capaz de gerar um nível de contaminação com endotoxinas superior ao necessário (250 EU/mL) para permitir a continuidade da

validação sem necessidade de contaminação adicional do equipamento de forma a demonstrar a redução de 1000 X deste contaminante, após o processo de limpeza.

De acordo com o FDA (1003), a determinação dos limites de resíduos para validação de limpeza, estabelecidos pelas empresas produtoras deve ser lógica e baseada no conhecimento do fabricante em relação aos materiais envolvidos e estes limites devem ser práticos, atingíveis e passíveis de verificação. Como o equipamento é dedicado à fermentação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, o contaminante específico ao processo selecionado nesta validação foi a endotoxina, uma vez que este processo gera uma grande quantidade deste resíduo no fermentador.

Como o pH se manteve próximo à neutralidade, dentro dos limites especificados na USP XXVII para WFI, pode-se concluir que não houve resíduo significativo do agente de limpeza utilizado (NaOH). Este fato foi confirmado uma vez que a condutividade também apresentou valores bem abaixo do especificado.

Os valores de concentração de TOC obtidos indicam que os contaminantes orgânicos provenientes do processo de cultivo das bactérias foram removidos até um nível seguro para a realização do processo subsequente. Estes contaminantes orgânicos poderiam ter origem no meio de cultivo e nas próprias células bacterianas.

O principal resíduo do processo fermentativo são as endotoxinas derivadas das paredes celulares das bactérias gram negativas. Após a limpeza do fermentador, pode-se observar que a concentração de endotoxina, anteriormente acima das 250 EU/mL, caiu para valores abaixo do especificado pela USP XXVII (0,25 EU/mL), evitando o carreamento deste para o processo subsequente.

O processo de limpeza se mostrou eficiente na remoção dos resíduos do processo de cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, gerando uma segurança para a execução de novos processos no mesmo equipamento uma vez que todos os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados na água de rinsagem final se mantiveram dentro dos limites especificados pela USP XXVII para água para injetáveis, o que demonstra que não há resíduo em concentração indevida proveniente do cultivo ou da limpeza do equipamento.

IV.6 Validação do processo de fermentação

Na Figura 15 pode-se observar as curvas de variação de D.O., que estão relacionadas com o crescimento da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIOSTAT D200, em função do tempo de cultivo.

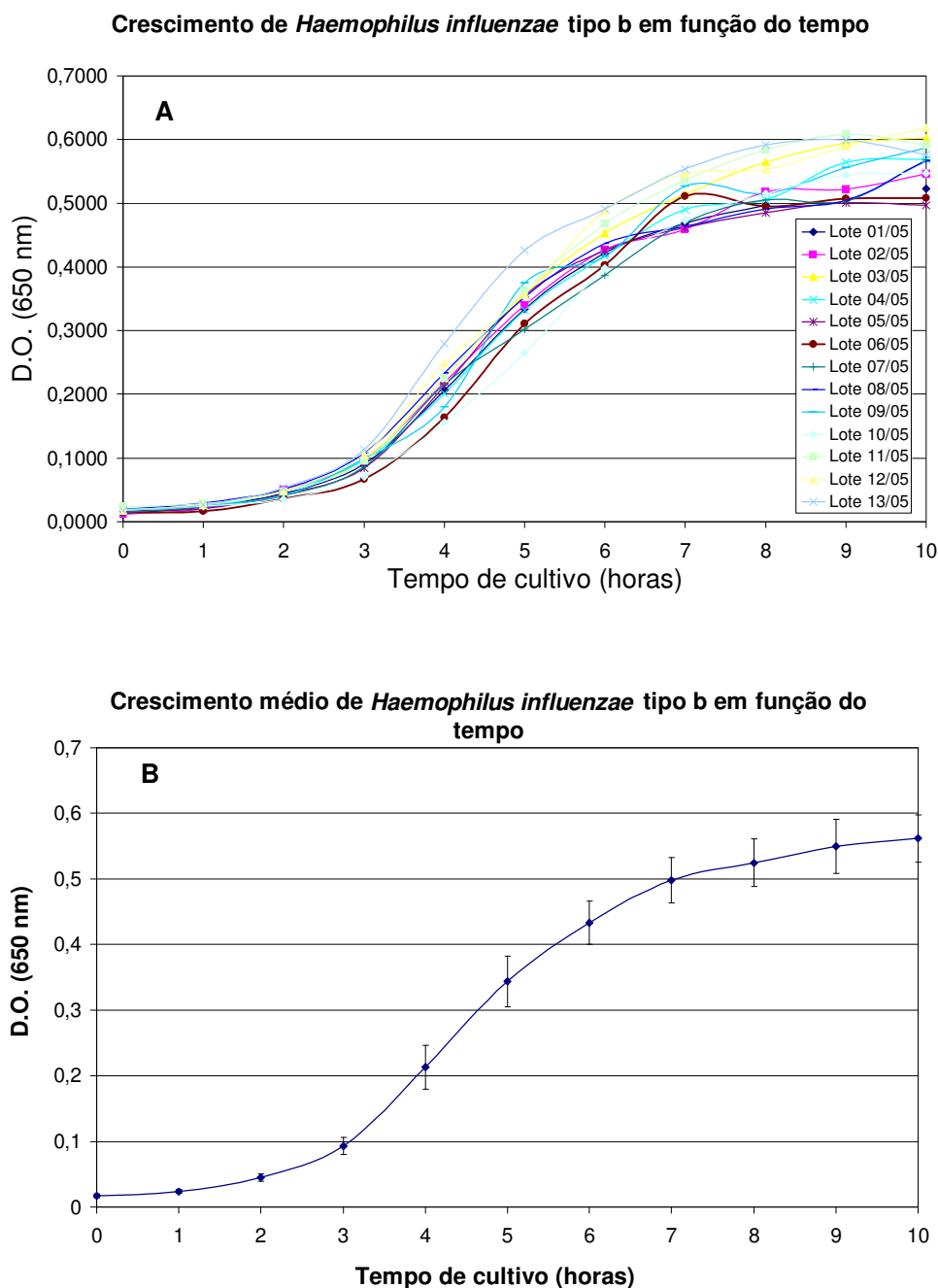


Figura 15: Gráficos de crescimento microbiano (variação de D.O.) em função do tempo de fermentação. (A)- Curvas de crescimento individuais dos 13 lotes analisados. (B)- Curva de crescimento médio com desvio padrão de cada ponto.

Na Figura 15 (A) pode-se observar que o perfil de crescimento foi similar nos 13 lotes estudados sendo que ocorreram algumas variações mais significativas a partir das 4 horas de cultivo onde as curvas apresentaram uma diferença em D.O que variou em cerca de 0,15 unidades. Esta variação se manteve constante até o tempo final da fermentação (10 horas).

Este fato pode ser mais facilmente observado na Figura 15 (B) onde foi plotada a curva de crescimento médio com os respectivos desvios-padrão para cada instante de tempo analisado.

Uma série de fatores pode levar a este aumento de variação entre as curvas nos pontos onde a quantidade de microrganismo é maior. Dentre estes fatores estão: diferença na taxa de crescimento, incerteza na medida da absorbância em D.O. mais elevadas, precipitação das células na amostra ou análises realizadas por diferentes operadores. Entretanto, estas variações não indicaram problemas na evolução do processo fermentativo, sendo assim, as taxas instantâneas foram calculadas e analisadas.

A curva de crescimento média da Hib obtida a partir da média dos 13 lotes consecutivos de fermentação demonstra um período inicial de cerca de 3 horas onde a variação de D.O. é bem baixa o que indica uma baixa taxa de crescimento da bactéria. Até este ponto, a variação foi de cerca de 0,1 unidade de D.O.

A partir do tempo de 3 horas até o tempo de 7 horas observa-se a maior variação de D.O. em função do tempo na curva o que indica a maior taxa de crescimento da bactéria. Após um tempo de 7 horas ainda foi observado um crescimento, porém de menor grandeza, uma variação de cerca de 0,7 unidades de D.O. até o tempo de 10 horas, demonstrando que o sistema está tendendo ao equilíbrio entre divisão e morte celular.

Quando uma determinada bactéria é semeada num meio líquido de composição apropriada e incubada em temperatura adequada, o seu crescimento segue uma curva definida e característica conforme demonstrado na Figura 16.

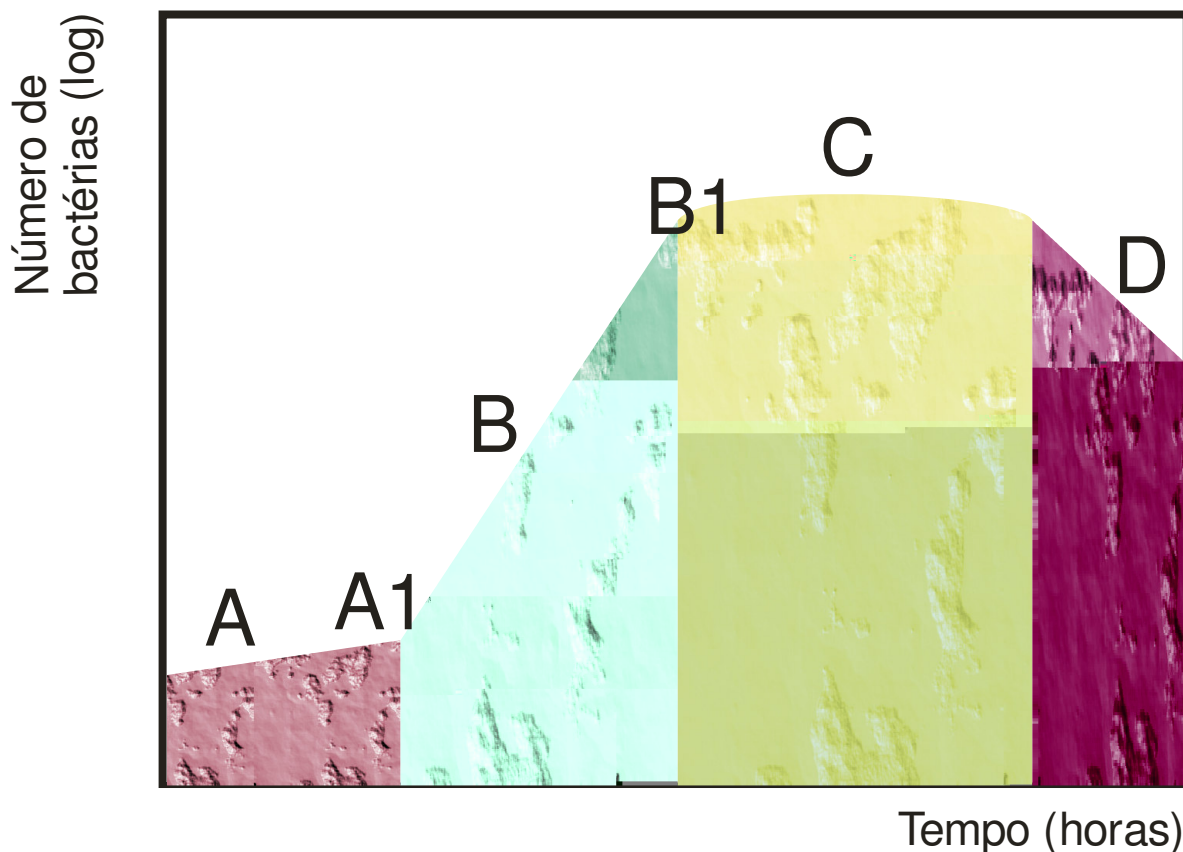


Figura 16: Curva padrão de crescimento bacteriano

Na Figura 16 podem-se notar as fases de crescimento típicas do cultivo de microrganismos. As fases estão descritas a seguir

A fase Lag (A) é a fase inicial onde as células são transferidas para o interior do fermentador. Esta é a fase que representa o período necessário para adaptação das células ao novo ambiente. As células nesta fase aumentam de volume em cerca de duas a quatro vezes, mas se dividem com uma taxa de crescimento muito pequena. Nesta fase há a síntese de DNA e de novas proteínas e enzimas, de forma a preparar as células para a divisão celular. Ao final desta fase há uma aceleração do crescimento (A1).

Na fase exponencial (B) as células estão se dividindo a uma taxa máxima constante de crescimento celular. Os componentes celulares como RNA, proteínas, e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante. Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase Lag. Então, o cultivo normalmente chega a uma fase de desaceleração do crescimento (B1) devido à

diminuição dos nutrientes essenciais, diminuição da concentração de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos no meio de cultivo.

Durante a fase estacionária (C) há rápido decréscimo na taxa de divisão celular. Desta forma, a taxa de crescimento é igual à taxa de morte do microrganismo, resultando em uma população celular estacionária. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogênio, amido e lipídeos.

Na fase de morte ou declínio (D), quando as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento devido ao acúmulo de produtos tóxicos e esgotamento nutricional, a taxa de crescimento celular é inferior à taxa de morte celular e desta forma as células mortas aumentam em números elevados. Nesta fase o meio se encontra deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos.

Comparando-se as curvas de crescimento obtidas nos processos fermentativos de *Haemophilus influenzae* tipo b dos 13 lotes analisados (Figura 15-A) com a curva padrão de crescimento microbiano (Figura 16) pode-se notar que o processo se comportou conforme o esperado e que este foi sempre interrompido no início da fase estacionária.

Como o cultivo analisado tinha como objetivo a produção de polissacarídeo secretado pelas bactérias no meio de líquido, não havia interesse em dar continuidade ao processo fermentativo uma vez que isso iria diminuir o rendimento em relação ao produto de interesse e dificultar a purificação do mesmo que é a etapa posterior ao cultivo.

Desta forma, conclui-se que as curvas de crescimento, até o ponto onde foi acompanhado (início da fase estacionária), seguiram o padrão descrito na literatura para crescimento microbiano.

Na Tabela 7 estão descritos os dados médios com os respectivos desvios-padrão de todos os parâmetros monitorados durante os processos fermentativos dos 13 lotes produzidos em 2005. Os resultados individuais de cada lote estão descritos no Apêndice VII.1.

Tabela 7: Valores médios dos resultados dos parâmetros analisados durante os 13 processos fermentativos com desvio padrão e % do desvio padrão em relação a média

	Tempo de cultivo (h)	D.O. 650nm	pH	O ₂ (% Sat.)	Agitação (rpm)	Vazão-Ar (L/min)	Consumo NaOH (g)
Média	0	0,017	7,20	56,3	60	12,4	0,0
	1	0,024	7,18	24,6	82	22,2	34,6
	2	0,045	7,17	24,4	110	31,0	96,1
	3	0,093	7,16	24,4	152	41,2	205,5
	4	0,213	7,17	24,8	161	51,1	319,0
	5	0,344	7,16	25,2	158	59,7	466,4
	6	0,433	7,17	25,0	153	62,3	659,3
	7	0,498	7,16	24,7	147	65,6	873,8
	8	0,525	7,14	26,6	146	67,2	1034,3
	9	0,549	6,99	38,8	147	67,2	1061,1
	10	0,562	7,11	50,5	146	67,2	1018,0
Desvio Padrão	0	0,003	0,04	17,1	17	11,5	0,1
	1	0,003	0,02	0,8	26	20,7	47,6
	2	0,006	0,01	1,1	30	27,7	68,2
	3	0,013	0,00	1,5	9	33,6	67,9
	4	0,034	0,01	0,7	6	32,5	118,1
	5	0,039	0,01	1,2	5	29,8	154,6
	6	0,033	0,01	0,7	4	26,7	178,0
	7	0,035	0,01	0,5	5	23,6	183,0
	8	0,036	0,06	3,0	7	25,8	149,7
	9	0,041	0,06	4,9	8	25,8	196,4
	10	0,036	0,83	6,0	7	25,8	144,2
% do DP em relação a média	0	18	1	30	28	93	361
	1	14	0	3	32	93	138
	2	13	0	5	27	89	71
	3	14	0	6	6	81	33
	4	16	0	3	4	64	37
	5	11	0	5	3	50	33
	6	8	0	3	3	43	27
	7	7	0	2	3	36	21
	8	7	1	11	5	38	14
	9	8	1	13	5	38	19
	10	6	12	12	5	38	14

Na Tabela 7 nota-se que a D.O. média subiu lentamente de 0,017 até 0,093 nas primeiras 3 horas de cultivo. A partir deste ponto, houve um aumento significativo no valor observado sendo que este variou de 0,213 a 0,525 unidades de D.O. até o tempo de cultivo de 8 horas. A partir das 9 horas de cultivo o crescimento diminui e conseqüentemente se observa novamente um aumento pequeno, de cerca de 0,013 unidades de D.O. até a interrupção da fermentação no tempo de 10 horas.

Durante todo o tempo de fermentação, o desvio-padrão (DP) da D.O. dos 13 lotes analisados aumentou conforme o andamento do processo. O DP variou desde 0,003, no tempo 0 h, até 0,041 unidades de D.O. no tempo 10 h. No entanto, a representatividade do DP em relação à média diminuiu de 17% até 6 % o que mostra que conforme a evolução do tempo de cultivo, o fermentador BIostat D200 foi capaz de controlar

Em paralelo a este resultado, observou-se que a agitação aumentou de 60 rpm até 152 rpm no tempo 3 h se mantendo praticamente constante no restante do processo. A representatividade do desvio-padrão em relação à média variou de 3 a 32 %.

A vazão de ar filtrado para o interior do equipamento variou de 12,4 até 67,2 L/min e a representatividade do desvio-padrão em relação à média variou de 38 a 93 %.

Conclui-se que os parâmetros de controle relacionados à agitação e vazão de ar variaram bastante de um processo para o outro de forma a manter constante a condição ideal de O₂ dissolvido para o crescimento da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b.

Estes resultados demonstram que o sistema automatizado de controle do fermentador foi capaz de variar, em uma faixa ampla, os parâmetros de controle (agitação, vazão de ar e adição de NaOH) de forma a garantir que os parâmetros cruciais ao crescimento bacteriano, tais como pH e O₂ dissolvido, se mantivessem dentro da faixa necessária possibilitando um processo robusto no que diz respeito ao crescimento da bactéria de interesse.

Para a elaboração dos gráficos de controle em relação à taxa de crescimento microbiano foram calculadas as taxas de variação de D.O. em função do tempo de cultivo.

Todos os valores das taxas calculadas para os 13 lotes de fermentação analisados, em todos os tempos de fermentação, de 1 a 10 horas estão demonstradas na Tabela 8. Além disso, estão demonstrados os desvios-padrão, a representatividade dos mesmos em relação às médias e os limites superiores (LS) e inferiores (LI) das áreas A, B e C a serem plotados nos gráficos.

Na Tabela 8, nota-se que a taxa média de variação de D.O. em função do tempo variou de 0,007 até 0,560 D.O./h do tempo 1 h até o tempo 10 h. O maior desvio-padrão (DP) observado foi de 0,040 no tempo 9 h. Pode-se observar, no entanto, que este DP se manteve praticamente constante no intervalo de tempo entre 4 e 10 h.

Além disso, pode-se observar que a representatividade dos desvios-padrão em relação às médias decaiu de cerca de 34 % no tempo 0 h até 6 % no tempo 10 h o que indica que conforme andamento do processo, a variabilidade observada não foi tão significativa e que o processo se manteve estável nos 13 lotes observados.

Tabela 8: Taxa de crescimento (variação de D.O./h) para cada tempo de cultivo com desvio-padrão e cálculos do limite superior e inferior

	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h
Lote 01/05	0,010	0,039	0,087	0,203	0,332	0,420	0,467	0,495	0,521	0,522
Lote 02/05	0,008	0,044	0,094	0,216	0,338	0,425	0,458	0,517	0,521	0,544
Lote 03/05	0,008	0,041	0,092	0,221	0,355	0,450	0,511	0,563	0,593	0,600
Lote 04/05	0,008	0,040	0,092	0,198	0,329	0,415	0,487	0,504	0,563	0,568
Lote 05/05	0,004	0,035	0,078	0,209	0,352	0,423	0,459	0,483	0,499	0,495
Lote 06/05	0,002	0,029	0,062	0,160	0,307	0,401	0,509	0,493	0,505	0,507
Lote 07/05	0,009	0,034	0,082	0,212	0,300	0,385	0,468	0,504	0,502	0,567
Lote 08/05	0,009	0,041	0,101	0,229	0,348	0,434	0,461	0,489	0,502	0,564
Lote 09/05	0,006	0,032	0,092	0,175	0,370	0,413	0,524	0,513	0,553	0,585
Lote 10/05	0,006	0,026	0,065	0,152	0,260	0,395	0,470	0,513	0,542	0,545
Lote 11/05	0,005	0,036	0,088	0,220	0,359	0,464	0,533	0,581	0,606	0,590
Lote 12/05	0,008	0,040	0,099	0,245	0,352	0,485	0,544	0,551	0,588	0,617
Lote 07/20	0,009	0,034	0,082	0,212	0,300	0,385	0,468	0,504	0,502	0,567
Lote 08/20	0,009	0,041	0,101	0,229	0,348	0,434	0,461	0,489	0,502	0,564
Lote 09/20	0,006	0,032	0,092	0,175	0,370	0,413	0,524	0,513	0,553	0,585
Lote 10/20	0,006	0,026	0,065	0,152	0,260	0,395	0,470	0,513	0,542	0,545
Lote 11/20	0,005	0,036	0,088	0,220	0,359	0,464	0,533	0,581	0,606	0,590
Lote 12/20	0,008	0,040	0,099	0,245	0,352	0,485	0,544	0,551	0,588	0,617

Na Tabela 8 também são demonstrados os valores dos limites superior e inferior das zonas A, B e C já calculados. Nenhum dos valores de taxa de variação de D.O. em função do tempo, obtidos individualmente para cada lote de fermentação, em todos os tempos de cultivo, ficou acima ou abaixo dos limites superior ou inferior da zona A.

De acordo com a norma NBR 11469 (ABNT, 1990) qualquer valor além da zona A representa uma falta de controle estatístico do processo.

Sendo assim, conclui-se que o processo de cultivo de *Haemophilus influenzae* do tipo b, no fermentador BIOSTAT D200 apresenta robustez em relação à taxa de crescimento microbiano o que garante a geração de um produto mais homogêneo e padronizado para a etapa subsequente de purificação do polissacarídeo de interesse.

Para verificar se houve alguma tendência nos resultados foram construídos gráficos de controle por variáveis com valores individuais e gráficos de amplitude móvel com $n=2$, para cada tempo de cultivo contendo os valores de taxas de variação de D.O. dos 13 lotes analisados. Estes gráficos seguiram os princípios descritos na norma NBR 11469 (ABNT, 1990)

Estes gráficos podem ser observados na Figura 17 (1 a 10).

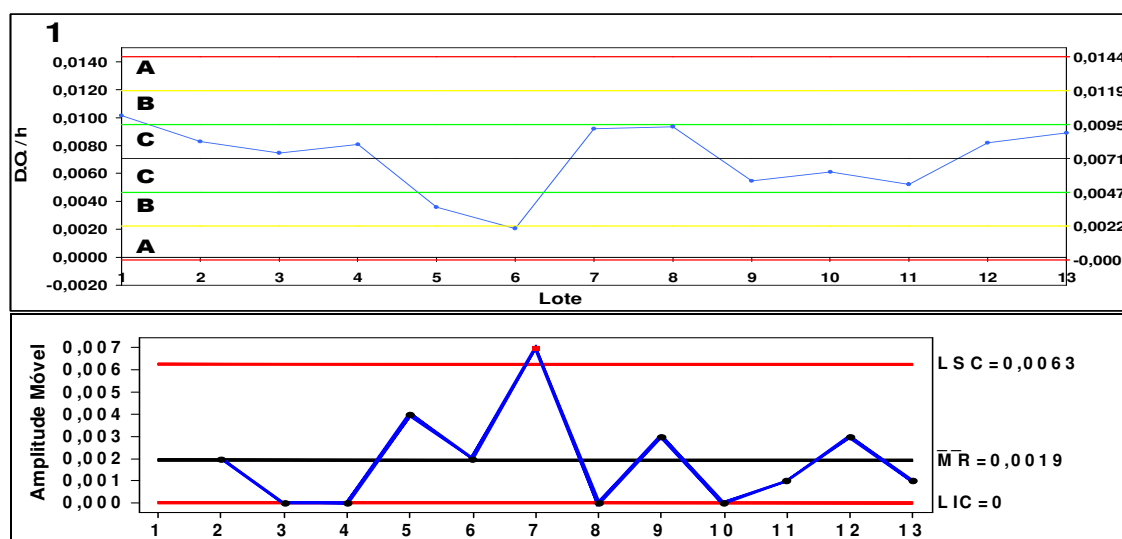
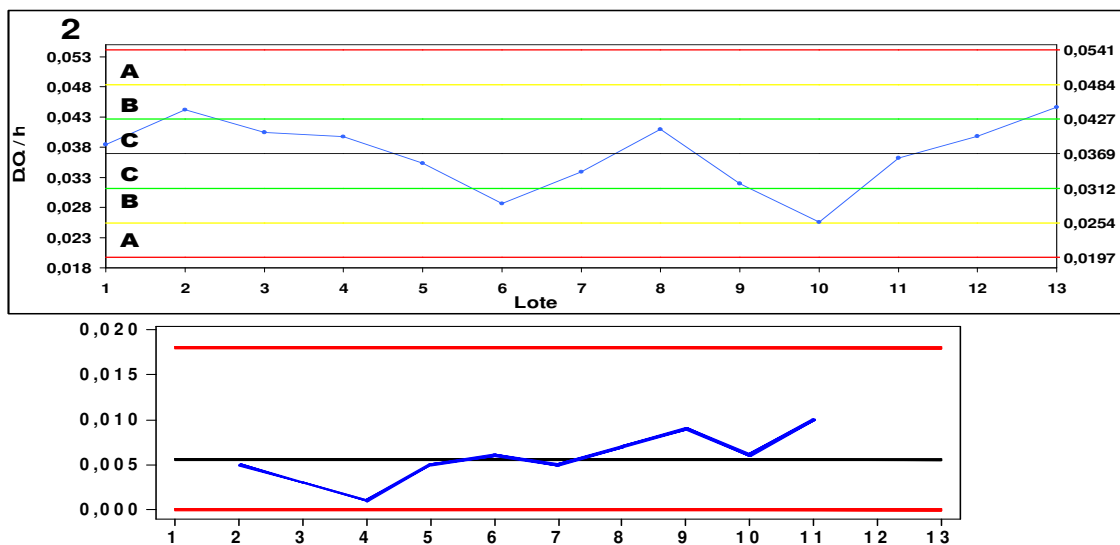
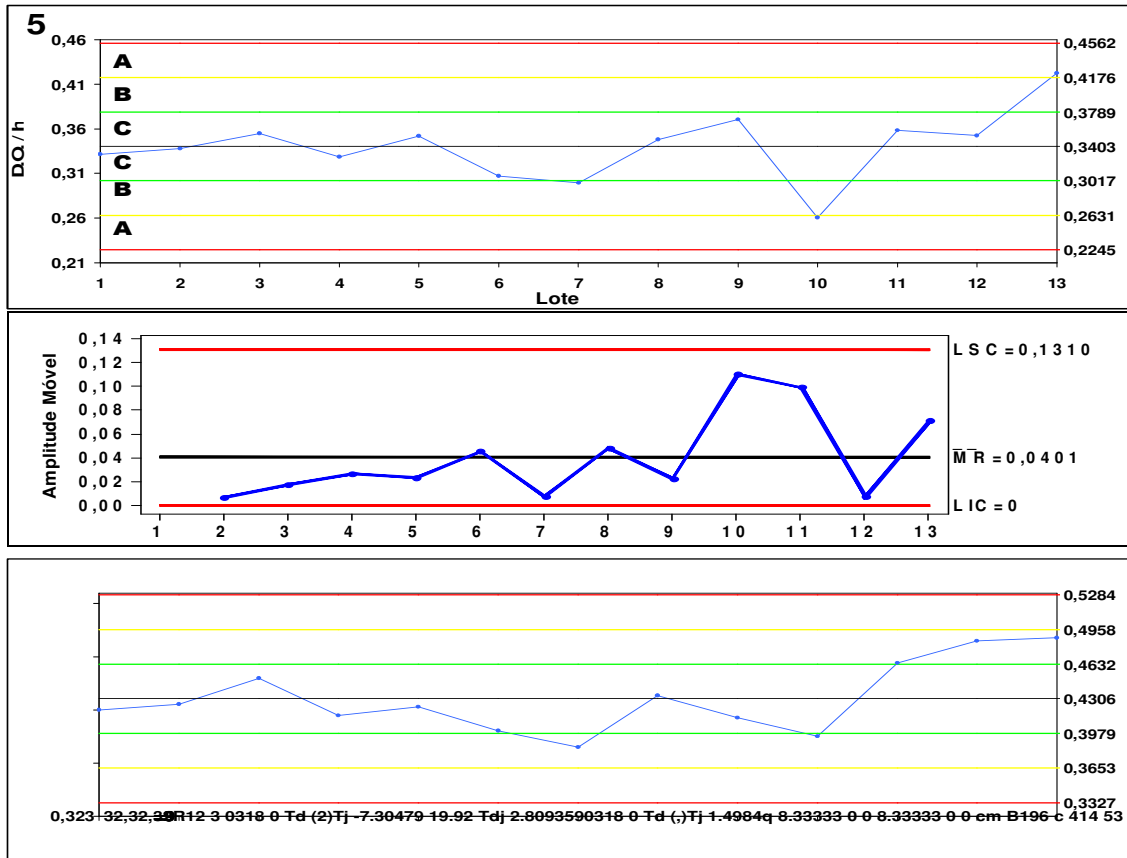


Figura 17 (1): Gráficos de controle por variáveis e gráficos de amplitude móvel com $n=2$, para o tempo de cultivo de 1h contendo os valores de taxas de variação de D.O. dos 13 lotes analisados





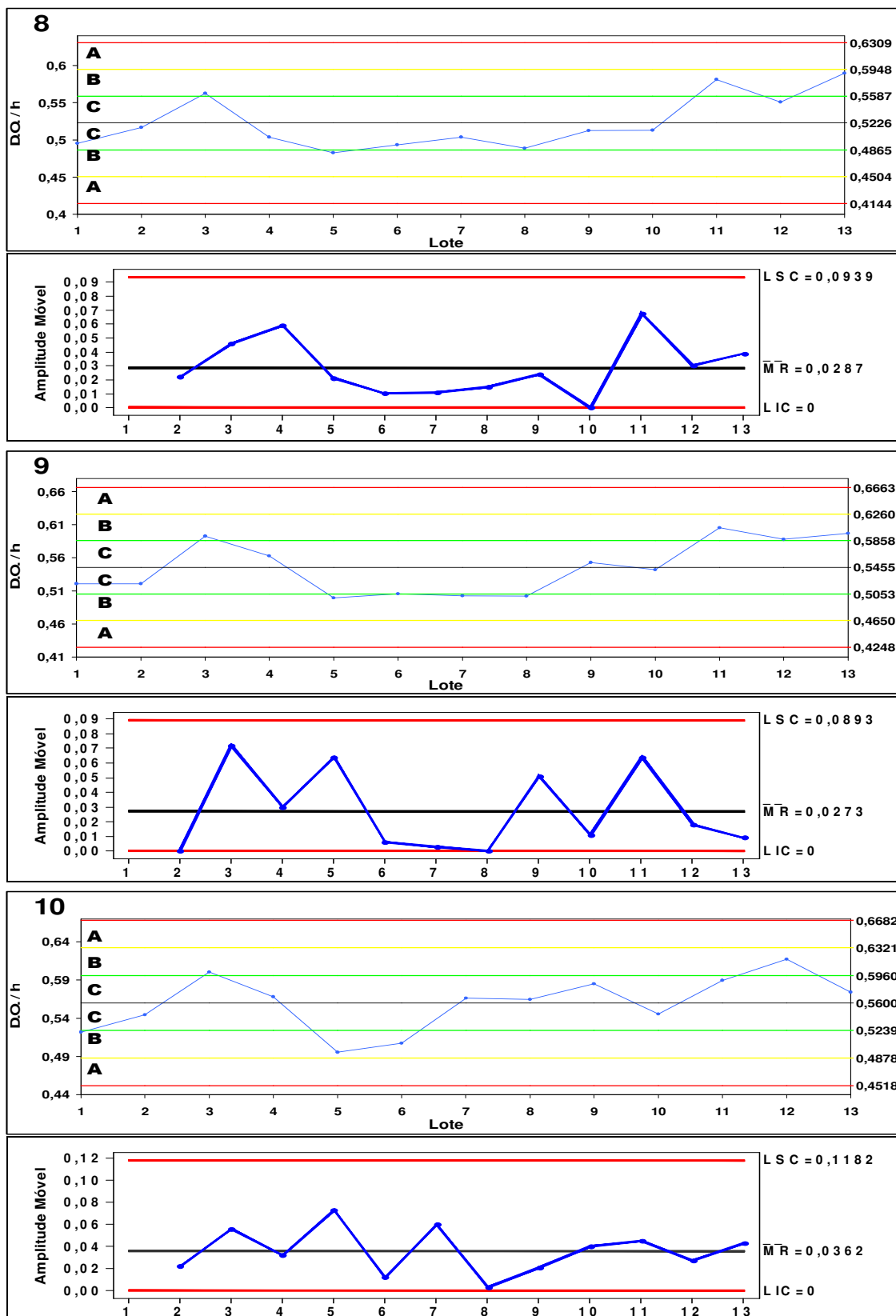


Figura 20 (8 a 10): Gráficos de controle por variáveis e gráficos de amplitude móvel com n=2, para os tempos de cultivo de 8h, 9h e 10h contendo os valores de taxas de variação de D.O. dos 13 lotes analisados

Na Figura 17, pode-se perceber que em nenhum dos tempos de cultivo analisados os valores plotados das taxas de variação de D.O. em função do tempo (linha azul) ultrapassou os limites superior ou inferior da zona A. Na verdade, somente 3 valores caíram na zona A indicando que o processo se comportou de forma estável.

O primeiro deles foi o último ponto (lote 13) do gráfico correspondente ao tempo 4 h que apresentou valor de 0,276 D.O./h enquanto que o limite superior da zona B foi de 0,2756 D.O./h (Figura 17 4).

Além deste, no gráfico correspondente ao tempo 5 h, o ponto correspondente ao lote 10, com valor de 0,260 D.O./h ficou abaixo do limite inferior da zona B cujo valor foi de 0,2631 D.O./h e o ponto correspondente ao lote 13, com valor de 0,495 D.O./h ficou acima do limite superior da zona B cujo valor obtido foi 0,4878 D.O./h (Figura 17, 5).

De qualquer forma, como estavam dentro dos limites superior e inferior da zona A, pode-se concluir que o processo de fermentação se mostrou sob controle estatístico.

Executando-se os testes descritos no item III.3.8 da metodologia na Figura 11 para verificação de presença de tendência ou identificação de causas especiais pode-se verificar que nenhum deles apresentou pontos além da zona A, uma seqüência de 9 pontos na zona C, seqüência de 6 pontos ascendentes ou descendentes, 14 pontos seqüenciais alternados para cima e para baixo, 2 em 3 pontos seguidos na zona A ou além, 4 entre 5 pontos seguidos na zona B ou além, 15 pontos seguidos na zona C (abaixo ou acima da linha central) ou 8 pontos seguidos em ambos os lados da linha central sem nenhum na zona C.

Desta forma, além de ser um processo robusto, e sob controle estatístico, o cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIostat D200 não apresentou nenhum tipo de tendência ou causa especial nos 13 lotes avaliados, demonstrando que este gera resultados de taxa de crescimento aleatórios, porém dentro de uma faixa considerável aceitável.

Em relação aos gráficos de amplitude móvel, somente no tempo de 1 h foi observado 1 ponto acima do limite superior de confiança. Como tivemos poucos lotes para análise, esta análise pode estar prejudicada. Sendo assim, concluímos que somente com um número maior de lotes e construindo gráficos de amplitude móvel com $n > 2$ poderemos confirmar a real importância deste fato observado.

Após esta etapa concluída, foi necessária uma verificação do cultivo em relação à sua pureza uma vez que qualquer contaminante poderia prejudicar a etapa posterior de purificação do polissacarídeo.

A Tabela 9 demonstra os resultados de crescimento microbiano nas amostras coletadas para avaliação da pureza após a incubação a $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 120 h e 14 dias da semeadura em Agar Casoy e do inóculo em caldo caseína, respectivamente, e a $32,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por 14 dias do inóculo em caldo Tioglicolato.

Tabela 9: Resultado de crescimento microbiano para avaliação da pureza do cultivo final

	Semeadura em Agar Casoy			Inóculo em caldo caseína			Inóculo em caldo Tioglicolato		
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3	Frasco 1	Frasco 2	Frasco 3
Lote 01/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 02/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 03/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 04/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 05/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 06/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 07/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 08/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 09/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 10/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 11/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 12/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 13/05	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

Neg. – Ausência de crescimento

Na Tabela 9 pode-se observar que nenhuma das placas de Petri com a semeadura em Agar Casoy e nenhum dos frascos de caldo caseína e Tioglicolato que foram inoculados com as amostras do cultivo final apresentou crescimento microbiano.

Todos os meios de cultivo utilizados nesta avaliação foram previamente aprovados quanto à esterilidade e quanto à promoção de crescimento com cepas padrão conforme descrito na Farmacopéia Americana (USP XXVII, 2001).

Como não foi observado crescimento de outros microrganismos nestes meios inespecíficos, podemos concluir que todas as manipulações, nos 13 lotes analisados, ocorreram de forma a evitar a contaminação do cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b.

Este fato também reforça a idéia de que o fermentador, após sua esterilização, mantém sua estanqueidade garantindo a integridade do cultivo em relação a contaminações microbiológicas por outro agente senão o de interesse. Conclui-se que, o processo é robusto no que diz respeito à geração de produto livre de contaminações indesejadas.

A Tabela 10 demonstra os resultados de crescimento microbiano nas amostras coletadas para avaliação inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIOSTAT D 200 após a incubação a $36,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

Tabela 10: Resultado de crescimento microbiano para avaliação da inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIOSTAT D 200

	Semeadura em Agar chocolate		Inóculo em meio líquido de cultivo de Hib em erlenmeyer
	Placa 1	Placa 2	
Lote 01/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 02/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 03/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 04/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 05/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 06/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 07/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 08/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 09/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 10/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 11/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 12/05	Neg.	Neg.	Neg.
Lote 13/05	Neg.	Neg.	Neg.

Neg. – Ausência de crescimento

A Tabela 10 demonstra que nenhuma das placas de Petri com a semeadura em Agar chocolate e que nenhum dos frascos erlenmeyer contendo meio líquido para cultivo de Hib, que foram inoculados com as amostras coletadas após a execução do processo de inativação a 56 °C, apresentou crescimento microbiano.

Todos os meios de cultivo utilizados nesta avaliação também foram previamente aprovados quanto à esterilidade e quanto à promoção de crescimento com cepas padrão conforme descrito na Farmacopéia Americana (USP XXVII, 2001)

Como não foi observado crescimento de colônias nas placas de Petri ou turvação do meio líquido, pode-se concluir que a etapa de inativação realizada no fermentador BIOSTAT D200 foi eficaz no que diz respeito à morte das bactérias *Haemophilus influenzae* tipo b cultivadas no equipamento.

Desta forma, o processo de fermentação, além de robusto no que diz respeito à produção de massa bacteriana e conseqüentemente do polissacarídeo de interesse para a produção da vacina contra Hib, se mostra seguro em relação às manipulações posteriores de purificação e descarte do material fermentado uma vez que não há microrganismos viáveis no efluente do fermentador.

V - CONCLUSÕES E SUGESTÕES

V.1 Conclusões

➤ A concentração de esporos de *Geobacillus stearothermophilus* no lote do bioindicador utilizado foi de $2,28 \pm 0,14 \times 10^6$ esporos/ampola sendo assim, em termos de concentração este lote de bioindicador pôde ser utilizado na validação do processo de esterilização do fermentador BIOSTAT D200.

➤ O fermentador se encontrava instalado de acordo com as suas especificações descritas no manual técnico, sendo que todas as utilidades fornecidas ao equipamento, tais como rede elétrica, vapor puro, ar comprimido seco, água deionizada e água para injetáveis encontravam-se com a qualidade mínima requerida e com as especificações de vazão, pressão e tensão atendidas.

➤ O fermentador BIOSTAT D200 foi capaz de controlar de forma eficiente o processo de esterilização por vapor puro uma vez que a temperatura se manteve constante e próxima aos $121,10 \text{ }^\circ\text{C}$ durante o 20 minutos necessários ao processo.

➤ O processo de esterilização do fermentador foi eficiente no que diz respeito à destruição do microrganismo *Geobacillus stearothermophilus* numa população de aproximadamente $2,28 \pm 0,14 \times 10^6$ esporos.

➤ O fermentador estudado foi capaz de controlar de forma eficiente as condições de temperatura necessárias às etapas de cultivo e inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b uma vez que a temperatura se manteve constante próxima aos $36,5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante uma simulação do processo fermentativo com duração de 40 minutos e acima dos $56 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período mínimo de 12 minutos.

➤ O processo de limpeza se mostrou eficiente na remoção dos resíduos do processo de cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, gerando uma segurança para a execução de novos processos no mesmo equipamento, já que todos os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados na água de rinsagem final se mantiveram dentro dos limites especificados pela USP XXVII para água para injetáveis.

➤ As curvas de crescimento da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b, seguiram o padrão descrito na literatura para crescimento microbiano.

- O sistema automatizado de controle do fermentador foi capaz de variar, em uma faixa ampla, os parâmetros de controle (agitação, vazão de ar e adição de NaOH) de forma a garantir que os parâmetros cruciais ao crescimento bacteriano, tais como pH e O₂ dissolvido, se mantivessem dentro da faixa necessária possibilitando um processo eficiente no que diz respeito ao crescimento da bactéria de interesse.
- O processo de cultivo de *Haemophilus influenzae* do tipo b, no fermentador BIOSTAT D200 apresentou robustez em relação à taxa de crescimento microbiano garantindo a geração um produto homogêneo e padronizado para posterior etapa de purificação do polissacarídeo de interesse.
- Além de ter se mostrado um processo robusto, e sob controle estatístico, o cultivo da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIOSTAT D200 não apresentou nenhum tipo de tendência ou causa especial nos 13 lotes avaliados, demonstrando que este gera resultados de taxa de crescimento aleatórios, porém dentro de uma faixa considerável aceitável.
- Todas as manipulações, nos 13 lotes analisados, ocorreram de forma a evitar a contaminação do cultivo de *Haemophilus influenzae* tipo b uma vez que não foi observado crescimento de outros microrganismos nos meios inespecíficos.
- A etapa de inativação realizada no fermentador BIOSTAT D200 foi eficaz no que diz respeito a provocar a morte das bactérias *Haemophilus influenzae* tipo b cultivadas.
- A metodologia proposta, envolvendo a coleta de dados históricos dos resultados das análises de controle de processo e elaboração de gráficos de controle se mostrou adequada para a execução da validação da fermentação de *Haemophilus influenzae* tipo b no fermentador BIOSTAT D200.
- Os processos de esterilização e limpeza do fermentador BIOSTAT D200, bem como os processos de cultivo e inativação da bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b foram, portanto, considerados validados.

V.2 Sugestões

- Avaliar a possibilidade de aplicação da metodologia de validação proposta em outros processos fermentativos executados em Bio-Manguinhos

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. G.; DEEVER, K. A.; COCHI, S. L.; PLIKAITIS, B. D.; ZEEL, E. R.; BROOME, C. V.; WENGER, J. D. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. **J. Amer. Med. Assoc.**, 1993, 269:2, 221-226.

American Academy of Pediatrics. PETER, G. (ed) 1997 **Red Book: Report of Committee on Infectious Diseases**. 24th ed. Elk Grove VilVid

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 13485, **Produtos para a saúde - Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos para fins regulamentares**, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 9000, **Sistemas de gestão da qualidade - Fundamentos e vocabulário**, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – NBR ISO 9001, **Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos**, 2000.

ATHAIDE, A. Validação comprova e documenta qualidade dos produtos e equipamentos. **Contr. de Contam.**, 2000, 16-22.

BIJLMER, H. A. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* invasive disease in developing countries and intervention strategies. In: Ellis, R.W.; Granoff, D.M. (eds) **Development and use of *Haemophilus b* conjugate vaccines**. New York: Marcel Decker, 1994, 247-264.

BIJLMER, H. A.; EVANS, N. L; CAMPBELL, H. Carriage of *Haemophilus influenzae* type b in health Gambian children. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1989, 83, 831-835.

BIO-MANGUINHOS, DI 0498 – **Determinação do número de microrganismos viáveis nos bioindicadores tipo ampola**, 2006.

BIO-MANGUINHOS, DI 1114 - **Lavagem do fermentador BIostat D200**, 2005.

BIO-MANGUINHOS, DI 1129 - **Cultivo de *Haemophilus influenzae* TIPO b**, 2005.

BIO-MANGUINHOS, **Manual de Validação**, Rio de Janeiro, rev. 01, 2005.

BOOY, R.; HODSGSON, S.; GRIFFITHS, H.; CHAPEL, H.M.; MOXO, R. Antibody persistence after accelerated immunization against *Haemophilus influenzae* type b. **BMJ**, 1993, 306, 971-972.

BOUSKELA, M.A.L. **Revisão sobre aspectos epidemiológicos do *Haemophilus influenzae* type b**. São Paulo, 1995. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). **Biotec. Ind.: Eng. Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001b, 2, 205-222.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). **Biotec. Ind.: Eng. Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001a, 2, 193-204.

CRISEL, R.M., BAKER, R.S., DORMAN, D.E. Capsular polymer of *Haemophilus influenzae* type b. I. Structural characterization of the capsular polymer of strain Eagan. **J. Biol. Chem.**, 1975, 250, 4926-4930.

EDUARDO, J.H.P. **Fermentação Contínua. Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, 1991, 9:4/5, 42-45.

ELLIS, R. W.; GRANOF, D. M. **Development and clinical uses of *Haemophilus b* conjugate vaccines**, New York, Ed. Marcel Dekker, Inc, 1994.

EMANUELLI, T.; SCANDIUZZI, M. **Validação de processos na indústria farmacêutica**. In: Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos, 2000. Rio Grande do Sul, Apostila do curso.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). **Biotec. Ind.: Eng. Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, 2, 223-246.

FEIGENBAUM, A. V. **Controle da qualidade total**. São Paulo: Makróns Books, 1994. v.1, 205p.

FUNKHOUSER, A.; STEINHOFF, M. C.; WARD, J. *Haemophilus influenzae* disease and immunization in developing countries. **Rev. Infect. Dis.**, 1991, 13, 542-554.

G.E. **Ficha Técnica do frascos para análise de TOC**, 2006.

GAMP Forum Steering Committee. **The Good Automated Manufacturing Practice**, ISPE, 4th Ed., (2001)

GARPENHOIT, O.; SILFVERDAL, A.S.; HUGOSSON, S.; FREDLUND, H.; BODIN, L.; ROMANUS, V.; OLCÉN, P. The impact of *Haemophilus influenzae* type b vaccination in Sweden. **Scand. J. Infect. Dis.** 1996, 28, 165-169.

GORDON, L. K. ***Haemophilus influenzae* b polysaccharide – Diphtheria toxoid conjugate vaccine.** U.S. Pat. N^o 4.496.538, 1985.

GRANOFF, D. M.; CATES, K. L. *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines. **J. Ped.**, 1985, 107:3, 330-336.

GREENWOOD, B.M. Epidemiology of acute lower respiratory tract infections, especially those due to *Haemophilus influenzae* type b, in The Gambia, West Africa. **J. Infect. Dis.**, 1992, 165, 26-28.

HILLEMANN, M. R.; TAI, J. Y.; TOLMAN, R. L.; VELLA, P. P. **Coupled *Haemophilus influenzae* type b vaccine.** Europ. Pat. N^o 0.117.783 A2, 1984.

INGRAM, D. J. *Six Sigma and Process Validation Strategies – A Guide to using the tools and Concepts of Six Sigma Quality to Support Process Validation Efforts: Part I*, **J. of Val. Tech.**, 2000, 6: 3.

INGRAM, D. J. *Six Sigma and Process Validation Strategies – Part II*, **J. of Val. Tech.**, 2000, 6: 4.

INGRAM, D. J. *Six Sigma and Process Validation Strategies – Part III – Implementation*, **J. of Val. Tech.**, 2000, 7:1.

ISHIKAWA, K. **Controle de qualidade total: à maneira japonesa.** 6. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1993. 221p.

JOKLIK, W. K.; WILLETT, H. P.; AMOS, D. B.; WILFERT, C. M. ***Haemophilus.*** **Zinzer Microbiology**, 20^a ed., Califórnia: Ed. Appleton, Lange, Cap. 27, 1992.

KUO, J. **Isolation and purification of polyribosyl ribitol phosphate from *Haemophilus influenzae* type b.** U.S. Pat. N^o 4.220.717, 1980.

MERRITT, J.; ALLARD, G.; TOOLE, L.; SWARTZ, R.; LICARI, P. Development and scale-up of a fed-batch process for the production of capsular polysaccharide from *Haemophilus influenzae*, **J. of Biotech.**, 2000, 81, 189–197.

MICHAELS, R.H.; POZIVIAK, C.S.; STONEBRAKER, F.E.; NORDEN, C.W. Factors affecting pharyngeal *H. influenzae* type b colonization rates in children. **J. lin Microb.**, 1976, 4, 413-417.

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Relatório do Grupo Técnico em Meningite** – 2000.

MMWR, Morbidity and Mortality Weekly report. **Haemophilus b conjugate vaccines for prevention of Haemophilus influenzae type b disease among infants and children two months of age and older. Recommendations of Immunization Practices Advisory Comitee (ACIP)**. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for disease control, Atlanta, 1991, 1-7.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade**, 4^a ed., 2004, LTC, 532 p.

MORETTO, L. D. **Supervisão da Produção**. 3^a ed. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1998. 129p.

MORETTO, L. D.; SHIB M. A era da validação. **Pharm. Tech.**, 2000, 4, 44-48.

MOXON, E. R. International Conference on prevention of Hib meningitis in the 1990s. **Vaccine**, 1991, 9

MURPHY, T.F. **Haemophilus**. In: Gorbact, S.L.; Barlett,J.G; Blacklow, N.R. (eds): Infect. Dis. Philadelphia, Saunders, 1992, 1521-1531.

PACE, G. W., **Microbial gums**. In: Bu' Lock, J., Kristiansen, B. (eds). Basic Biotech., London: Ed. Academic Press, 1981.

PASTEELNICK, L. A. **Analytical methods validation**. In: BERRY, I. R.; NASH, R. A. Pharmaceutical process validation. New York: Marcel Dekker, 1993, 411-428.

PITTMAN, M. The interrelation of amount of V – factor and the amount of air necessary for growth of *Haemophilus influenzae* type b in certain media. **J. Bact.**, 1935, 149-161.

REIS M. M. **Um Modelo para o Ensino do Controle Estatístico da Qualidade**. Doutorado (Tese em Engenharia de Produção) — Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

RIENSTRA, M. S.; SCATTERGOOD, E. M. **Process for removing bacterial endotoxina from Gram negative polysaccharides**. U.S. Pat. Nº 5.045.456, 1991.

RIENSTRA, M. S.; SCATTERGOOD, E. M; SITRIN, R. D. **Removal of endotoxina from *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide using a styrene and divinylbenzene copolymer**. In: Ataai, M. M.; Sehdar, S. K. (eds). *Aic. Biosep. Tech.*, 1992.

Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention. **Unites States Pharmacopeia**, 27^a ed., 2001.

RODRIGES, L. P.; SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B. Immunity to *Haemophilus influenzae* type b. **The J. of Immun.**, 1971, 104:4, 1071-1080.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher, 2001, 2, 179-192.

SCHNEERSON, R.; BARRERA, O.; SUTTON, A.; ROBBINS, J. B. Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide – protein conjugates. **The J. of Exper. Med.**, 1980, 152, 361-676.

SUTHERLAND, I. W. **Biothecnology of microbial exopolysaccharide**, Cambridge: Ed. Cambridge University Press, 1990.

US. FDA. **Guidance for Industry Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures — Scope and Application**, 2003.

US. FDA. **Guide to inspection of cleaning validation**, 1993.

US. FDA. **Guideline on General Principles of Process Validation**, 1987.

WEINER, R.; LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **J. Ind. Microb.**, 1995, 15, 339-346.

Who Position Paper on *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines, WHO, 1998, 73, 64-71

VII - APÊNDICE

VII.1 Resultados brutos dos parâmetros da fermentação

	Tempo de cultivo (h)	DO _{650nm} (X 11,111)	pH	pO ₂	Agitação (rpm)	Vazão/Ar (L/min)	Consumo Base (g)
Lote 01/05	0	0,1450	7,22	65	50	8	0
	1	0,2576	7,18	26,5	91	16	0
	2	0,5000	7,17	28	129	22,9	51,9
	3	1,0140	7,16	23,9	157	31,3	149,5
	4	2,2930	7,17	24,5	157	40,7	240
	5	3,7160	7,17	25,6	155	51,4	421
	6	4,6930	7,17	25,5	149	55	614,7
	7	5,2090	7,15	23,9	150	58,9	760,4
	8	5,5222	7,16	25,4	145	60	938,8
	9	5,5222	6,99	38,5	144	60	938,8
10	5,8111	6,87	51,7	144	60	938,8	
Lote 02/05	0	0,1300	7,18	44,5	60	8	0
	1	0,2220	7,16	24,2	97	16,8	116,3
	2	0,5560	7,16	24,3	128	25,9	218
	3	1,0890	7,16	24	155	32	292,8
	4	2,4300	7,17	24,8	151	42,3	585,5
	5	3,7790	7,17	24,5	153	52	638,9
	6	4,7470	7,16	24,9	157	55	775
	7	5,1020	7,15	25	156	54,2	961,8
	8	5,7590	7,15	25,9	151	60	1165
	9	5,8000	6,96	41,8	151	60	1505,5
10	6,0620	6,86	52,9	151	60	1165	
Lote 03/05	0	0,1950	7,18	73	50	8	0
	1	0,2780	7,17	24,3	93	17,6	141
	2	0,5470	7,17	24,6	121	24,3	207
	3	1,0890	7,17	24	146	32	295,6
	4	2,5060	7,17	25,4	161	47,2	397
	5	3,9820	7,17	25	157	51,2	545
	6	5,0310	7,17	25,2	151	55	797,2
	7	5,7070	7,17	24,2	146	60	1025,2
	8	6,2750	7,16	25	151	60	1227,8
	9	6,6100	7,01	37	157	60	1227,8
10	6,6888	6,89	51,5	149	60		
Lote 04/05	0	0,1792	7,2	26	76	12,1	0,2
	1	0,2688	7,19	24,1	84	16,9	43,4
	2	0,5313	7,16	24,8	108	22,6	44,9
	3	1,0810	7,16	23,9	159	33,1	137,3
	4	2,2400	7,17	26,7	160	40,1	185,4
	5	3,6890	7,15	28,34	161	51	185,9
	6	4,6400	7,17	25,1	151	53,9	511
	7	5,4400	7,17	25,8	142	59,1	710
	8	5,6170	7,15	25,8	142	60	847
	9	6,2750	7,02	39,1	142	60	847
10	6,3290	6,91	53,8	142	60	847	

	Tempo de cultivo (h)	DO _{650nm} (X 11,111)	pH	pO ₂	Agitação (rpm)	Vazão/Ar (L/min)	Consumo Base (g)
Lote 05/05	0	0,1840	7,25	73,3	50	8	0
	1	0,2240	7,21	24,2	89	16,4	0
	2	0,4848	7,17	23,9	117	22,9	35,2
	3	0,9312	7,16	23,8	151	31,3	121,9
	4	2,3640	7,17	24,3	159	42,3	194,3
	5	3,9460	7,16	24,5	157	51,2	340
	6	4,7280	7,16	24,1	159	54,4	340
	7	5,1290	7,15	24,7	144	59,3	672
	8	5,3860	7,17	24,7	140	60	853,8
	9	5,5666	7,01	35,3	149	60	853,8
10	5,5222	6,89	48,9	149	60	854,2	
Lote 06/05	0	0,1640	7,2	69	50	8	0
	1	0,1870	7,18	25,8	71	14,7	0
	2	0,4000	7,16	24	102	24	43,1
	3	0,7440	7,16	24,6	136	30,9	102
	4	1,8222	7,16	24,2	162	40,6	185
	5	3,4480	7,17	25,3	155	51,4	306
	6	4,4790	7,17	24,4	151	54,6	473
	7	5,6800	7,17	24,7	142	60	677,8
	8	5,4999	7,16	25,4	140	60	826,7
	9	5,6333	7,02	31,5	140	60	826,7
10	5,6530	6,91	44,8	140	60	826,7	
Lote 07/05	0	0,1584	7,23	69,3	50	8	0
	1	0,2608	7,19	24,1	84	16,2	0
	2	0,4560	7,18	24,1	116	23,1	149
	3	0,9600	7,16	23,7	155	32,9	272,1
	4	2,3999	7,16	24,4	155	42,7	341
	5	3,3599	7,18	25,3	153	52,3	575,5
	6	4,3020	7,18	25,1	147	54,8	679,2
	7	5,2180	7,16	24,9	140	59,2	819,7
	8	5,6170	7,17	25,4	136	60	1006,4
	9	5,5990	7,04	31,1	134	60	1006,4
10	6,3111	6,95	42	134	60	1006,4	
Lote 08/05	0	0,2190	7,28	47,2	50	8,4	0
	1	0,3230	7,22	24,3	104	17,9	0
	2	0,5650	7,17	23,8	123	22,9	0
	3	1,1900	7,16	23,5	153	31,8	167
	4	2,5950	7,18	25,7	162	41,4	258,2
	5	3,9110	7,14	26	152	51,4	345,2
	6	4,8530	7,16	25,4	154	55,4	556,7
	7	5,1550	7,17	24,3	148	59,5	748,5
	8	5,4570	7,19	25,5	148	60	1102,8
	9	5,6000	7,05	39,8	148	60	1102,8
10	6,2930	6,91	56	148	60	1102,8	

	Tempo de cultivo (h)	DO _{650nm} (X 11,111)	pH	pO ₂	Agitação (rpm)	Vazão/Ar (L/min)	Consumo Base (g)
Lote 09/05	0	0,2176	7,17	25,9	97	12,4	0
	1	0,2784	7,17	24,3	93	16,3	25,9
	2	0,4640	7,17	23,9	116	21,9	73,3
	3	1,0960	7,17	23,8	149	31,4	212,4
	4	2,0000	7,17	24,8	161	41,8	319
	5	4,1590	7,17	24,6	156	51	462,9
	6	4,6220	7,17	25,5	146	54,6	643,5
	7	5,8555	7,17	24,5	147	59,3	834,9
	8	5,7240	7,17	25,5	135	60	997,6
	9	6,1700	7,03	40,3	135	60	997,6
10	6,5240	6,95	40,3	135	60	997,6	
Lote 10/05	0	0,2000	7,16	62,5	52	8	0
	1	0,2680	7,18	25,4	67	16,1	35,6
	2	0,3840	7,17	24,3	102	24,9	76,7
	3	0,7856	7,17	29,2	136	33,8	189
	4	1,7333	7,17	24,1	172	44,2	241,3
	5	2,9330	7,16	24,6	163	51,3	344,5
	6	4,4260	7,16	24,6	159	54,9	541,6
	7	5,2555	7,16	25,5	148	59,8	742,9
	8	5,7240	7,16	25,4	144	60	919,7
	9	6,0440	6,95	34,9	144	60	926,6
10	6,0800	9,87	44,4	144	60	917,1	
Lote 11/05	0	0,2540	7,21	75	50	50	0
	1	0,3120	7,17	24,2	91	91	0
	2	0,5290	7,17	23,8	123	123	68,6
	3	1,0570	7,16	24,1	153	153	196,6
	4	2,5060	7,16	25,2	159	159	358,7
	5	4,0350	7,16	25,7	159	159	583,7
	6	5,2000	7,17	26	151	151	774,6
	7	5,9550	7,17	24,9	144	144	1068,2
	8	6,4888	7,16	25,2	153	153	1222,4
	9	6,7555	6,98	42,3	153	153	1222,4
10	6,5770	6,84	54,1	153	153	1222,4	
Lote 12/05	0	0,1950	7,15	50	91	13,4	0
	1	0,2860	7,17	24,3	101	16,7	72,7
	2	0,5400	7,17	24,2	125	21,9	138,2
	3	1,1690	7,16	23,6	157	30,5	261,9
	4	2,7666	7,17	24,2	172	39,9	413,7
	5	3,9550	7,16	24,7	166	51,2	656,7
	6	5,4222	7,16	23,5	159	55,2	930
	7	6,0666	7,17	24,5	153	60	1207,1
	8	6,1444	7,03	32,8	151	60	1207,1
	9	6,5550	6,89	45	151	60	1207,1
10	6,8770	6,79	56	151	60	1207,1	

Tempo de cultivo (h)	DO _{650nm} (X 11,111)	pH	pO ₂	Agitação (rpm)	Vazão/Ar (L/min)	Consumo Base (g)
0	0,1960	7,22	51,3	50	8,3	0
1	0,2950	7,17	24,2	1,4	16,4	14,7
2	0,5940	7,17	23,9	14	23,3	142,8
3	1,2540	7,16	24,7	172	32	273,3
4	3,1111	7,17	24,6	166	41,9	428
5	4,7333	7,17	23,4	170	51,2	658,5
6	5,4550	7,17	25,6	154	55,7	934,1
7	6,1560	7,17	24,1	153	59,6	1131,2
8	6,5770	7	33,9	157	60	1131,2
9	6,6550	6,86	48,1	157	60	1131,2
10	6,3990	6,74	60,2	157	60	1131,2

Lote 13/05

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)